Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg

Direktor: Professor Dr.med. K. Kochsiek

BAEE-ESTERASE (KALLIKREIN) AKTIVITÄT IM PAROTISSPEICHEL NORMOTONER RATTEN UND BEI RATTEN MIT VERSCHIEDENEN FORMEN DES EXPERIMENTELLEN HOCHDRUCKS (GENETISCHER-, RENOVASCULÄRER- UND DOCTMA-SALZ-HOCHDRUCK)

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Norbert Neff

aus Schneppenbach

Würzburg, den 1. Juli 1981

1982

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg

Direktor: Professor Dr.med. K. Kochsiek

BAEE-ESTERASE (KALLIKREIN) AKTIVITÄT IM PAROTISSPEICHEL NORMOTONER RATTEN UND BEI RATTEN MIT VERSCHIEDENEN FORMEN DES EXPERIMENTELLEN HOCHDRUCKS (GENETISCHER-, RENOVASCULÄRER- UND DOCTMA-SALZ-HOCHDRUCK)

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Norbert Neff

aus Schneppenbach

Würzburg, den 1. Juli 1981

Referent:	Priv.Doz. Dr.med. G. Schmid
Korreferent:	Professor Dr.med. K. Kochsiek
Dekan:	Professor Dr.med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Februar 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Meiner lieben Frau

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543522_0044

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
E I N L E I T U N G		1
	HISTORISCHES	
	ÜBERBLICK ÜBER DEN DERZEITIGEN WISSENSSTAND	
	1. Plasma Kallikrein-Bradykinin-System	2
	2. Drüsen Kallikrein-Kinin-System	2
M E T H O D I K		10
I.	TIERE UND TIERHALTUNG	10
II.	TIEREXPERIMENTELLE HOCHDRUCKMODELLE UND IHRE CHARAKTERISIERUNG	10
	1. Orale NaCl-Belastung und Kontrolltiere	11
	2. Spontanhypertensive Ratten (SH-Ratten) und Kontroll-Tiere	11
	3. Renovasculär-hypertone Ratten (RV-Ratten) und Kontroll-Tiere	12
	4. D.O.C.T.M.A. (Desoxycorticosteron-trimethyl-acetat) - SALZ-Hochdruck-Ratten (DH-Ratten) und Kontroll-Tiere	14
III.	SPEICHELKOLLEKTION	16
IV.	KALLIKREINAKTIVITÄTSMESSUNG UND -BERECHNUNG	21
	1. Theoretische Grundlagen	21
	2. Materialien, Herstellung der Lösungen bzw. Suspensionen	21
	3. Photometrische Aktivitätsmessung	23
	4. Berechnung der Enzymaktivität	25
E R G E B N I S S E		27
I.	BLUTDRUCKHÖHE UND -VERHALTEN BEI VERSCHIEDENEN HYPERTONIEFORMEN UND KONTROLLEN	28
II.	SPEICHELSEKRETIONSVOLUMEN VERSCHIEDENER HOCHDRUCKFORMEN BEI FRAKTIONIERTER PROBENSAMMLUNG	30
III.	BAEE-ESTERASE AKTIVITÄT BEI NORMOTENSIVEN RATTEN NACH ORALER KOCHSALZBELASTUNG	33

Seite

IV. BAEE-ESTERASE (KALLIKREIN) - AKTIVITÄT IM PAROTIS-SPEICHEL NORMOTONER UND HYPERTONER RATTEN 35

V. BAEE-ESTERASE (KALLIKREIN) - AKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER FLUSSRATE 38

VI. BAEE-ESTERASE (KALLIKREIN) - AKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER BLUTDRUCKHÖHE 40

VII. NATRIUM- UND KALIUM-KONZENTRATION IM PAROTIS-SPEICHEL NORMOTONER UND HYPERTONER RATTEN 43

VIII. NATRIUM- UND KALIUM-KONZENTRATION IM PAROTIS-SPEICHEL IN KORRELATION ZUR FLUSSRATE 47

DISKUSSION 50

I. KALLIKREIN BEI HYPERTONIE 50

II. ELEKTROLYTE UND KALLIKREIN BEI HYPERTONIE 53

III. SCHLUSSFOLGERUNG 54

ZUSAMMENFASSUNG 56

ANHANG ZUR METHODIK 58

LITERATURVERZEICHNIS I - VIII

EINLEITUNG

HISTORISCHES

E.K. FREY stellte 1925 in Experimenten an Hunden fest, daß Harn, in relativ geringen Mengen und in (durch wiederholte Adsorption) gereinigter Form appliziert, zu einer Blutdrucksenkung führt (FREY, KRAUT, WERLE 1968).

Aus dieser Erkenntnis heraus begannen FREY, KRAUT und WERLE die Suche nach der Substanz, die für diese Blutdrucksenkung verantwortlich war. Es konnten schließlich aus Harn Serin-Proteinasen eliminiert werden, die bei i.v. Applikation am narkotisierten Tier regelmäßig zu einer Blutdrucksenkung führten. Da diese Substanz auch in Bauchspeicheldrüsengewebe in relativ hoher Konzentration nachweisbar war, benannte man sie nach dem neben πάγκρεας für Bauchspeicheldrüse auch gebräuchlichen altgriechischen Wort καλλίκρεας = KALLIKREIN.

In den folgenden Jahren - etwa von 1930 bis 1935 - wurde von SECKER (1934), sowie von FELDBERG et al. (1935) festgestellt, daß ein Blutdruckabfall am narkotisierten Tier auch bei i.v. Verabreichung von gereinigtem Speichel zu verzeichnen war, und es wurde nachgewiesen, daß es sich um die gleiche Wirksubstanz handelte, eben wiederum um Kallikrein.

Damit war nachgewiesen, daß Kallikrein außer im Harn und in der Bauchspeicheldrüse auch im Speichel vorkam und analog jenem Kallikrein im Tierexperiment zu einer Erniedrigung des Blutdrucks führte.

ÜBERBLICK ÜBER DEN DERZEITIGEN WISSENSSTAND

Heute ist in menschlichen und tierischen Organismen das Vorkommen von zwei Kallikrein-Kininsystemen bekannt, deren pharmakologische Effekte sich weitgehend decken, deren physiologische Bedeutung allerdings als different und spezifisch anzusehen ist. In beiden Systemen besteht die Wirkung des Kallikrein in der Freisetzung hochwirksamer Peptidkinine durch Hydrolyse zweier chemischer Bindungen am Kininogen.

1. Plasma Kallikrein-Bradykinin-System

Im Plasma kommt nur das Glykoprotein Präkallikrein, in der Leber gebildet, mit einem MG von 100 000 vor (KAPLAN 1972, TAKAHASHI 1972). Präkallikreinaktivatoren setzen aus ihm die eigentliche Wirksubstanz, das Plasmakallikrein, frei, das seinerseits aus Kininogen das Bradykinin freisetzt (NAKAJIMA 1973) und dann sofort von mehreren Plasmaproteinasen inaktiviert wird.

Das Plasma Kallikreinsystem ist an der Blutgerinnung beteiligt und besitzt chemotaktische Aktivitäten gegenüber menschlichen neutrophilen Leukozyten (KAPLAN 1972). Seine Rolle bei der funktionellen Gefäßerweiterung ist umstritten; es wurden erhöhte Aktivitäten gegen Ende der Schwangerschaft gefunden (PERITI und GASPARRI 1966); am wehenbereiten Uterus konnten durch Kinininfusionen Wehen ausgelöst werden (EFFKEMANN, WERLE 1941), eine Belebung der Sexualfunktion durch verbesserte Durchblutung innersekretorischer Organe (Hypophyse, Nebenniere) ist beschrieben (HARTENBACH 1954, IGARASHI 1962). Eine Steigerung des Gewichtes von Hypophyse, Samenblase und Prostata wurde bei infantilen Tieren nach längerer Kallikreinapplikation festgestellt (WERLE, VOGEL, RÜDEL 1964).

2. Drüsen Kallikrein-Kinin-System

Drüsen-Kallikreine wurden nachgewiesen in den Bauchspeicheldrüsen von Hunden (KUTZBACH 1973) und Schweinen (TSCHESCHE 1976); im Darmtrakt von Ratten, Hunden, Schweinen und Menschen, im Urin von Pferden und Ratten (PROCELLI 1975 und NUSTAD 1974), im Urin von Menschen, Kaninchen und Hunden und im Speichel von Ratten und Menschen. Sie haben ein MG von 30 000, setzen aus Kininogen I und Kininogen II das lys-bradykinin (= Kallidin) frei (PIERCE 1961, WERLE 1961) und liegen in Speicheldrüsen, im Speichel und in der Niere ausschließlich in aktiver Form vor, während Pankreas, Darm und vielleicht auch Urin Präkallikrein enthalten (FREY, KRAUT, WERLE 1968).

Renales Kallikrein wird im Nierenparenchym, wahrscheinlich in den proximalen Tubuli, gebildei (WERLE und VOGEL 1960) und zeigt bei wiederholten Bestimmungen bei ein und demselben Probanden geringe Schwankungen, während die tägliche Kallikreinausscheidung bei verschiedenen Probanden erhebliche Unterschiede aufweist (HORTON 1959, 1960). Abhängigkeit der Kallikreinausscheidung im Harn von der Zusammensetzung der Nahrung (WERLE und VOGEL 1958, VOGEL 1962, WERLE 1966) und Abhängigkeit von der Elektrolytzufuhr sind beobachtet worden, ebenso hormonelle Einflüsse durch Glucocorticoide und Thyroxin (VOGEL 1962). Wechselwirkungen zum Renin-Angiotensinsystem wurden vermutet (WEBER 1977, JOHNSTON 1976).

Die Bildung der Darmkallikreine erfolgt in der Darmwand selbst; ihre physiologische Bedeutung ist weitgehend unbekannt.

In den Bauchspeicheldrüsen liegt Kallikrein überwiegend in unwirksamer Präkallikreinform vor, das als solches ins Darmlumen abgegeben und dort durch Trypsin aktiviert wird. Weitere Untersuchungen zeigten die Beeinflußbarkeit des Pankreaskallikreins durch Kostvariation und führten früher außerdem zu der Ansicht, daß in der Bauchspeicheldrüse noch ein "privates" Kininogenasekininsystem zur funktionellen Gefäßregulation existiert (WERLE 1960, VOGEL 1962, HILTON 1963 und 1966).

In Mundspeicheldrüsen liegt Kallikrein in aktiver Form vor und wird als solches in den Speichel abgegeben (FREY 1968). Der Gehalt verschiedener Speicheldrüsen an Kallikrein bei verschiedenen Spezies schwankt in weiten Grenzen (FREY 1968), wobei die Gl. submandibularis der Ratte von den bisher untersuchten den höchsten Gehalt aufweist. Die Lokalisierung des Enzyms in Gl. submandibularis und Gl. sublingualis der Ratte gelang mit speziellen Techniken im Zytoplasma der granulierten Tubuszellen und an der luminalen Zellseite der Streifenstücke (ØRSTAVIK 1975, BRANDTZAEG 1976). Nach parasympathischer Reizung findet sich Kallikrein in Speicheldrüsen erhöht (WERLE 1939). Atropin vermindert zwar die Spei-

chelsekretion, beeinflußt aber nicht den Übertritt von Kallikrein ins Interstitium.

Eine gesteigerte Durchblutung der Drüse und gesteigerte Speichelsekretion ließen sich durch Injektion von Kininen in das arterielle Gefäßsystem der Speicheldrüsen provozieren (WERLE 1966, HILTON 1955a,b; 1956, 1960), wobei wesentlich erscheint, daß diese Art der Vasodilatation verschieden ist von der durch parasympathische Stimulation erreichten Gefäßerweiterung (BHOOLA 1963, 1965, SCHACHTER 1966), so daß es wahrscheinlich ist, daß die Kinine nur eine Teilfunktion in der Durchblutungsregulierung der Speicheldrüsen haben. Andere Untersucher lehnen diese Hypothese ab (SCHACHTER 1966). Möglicherweise bewirken die Kinine in den Speicheldrüsen eine Permeabilitätssteigerung für hochmolekulare Substanzen (KROEGER 1966). Im Gegensatz zum Pankreaskallikrein läßt sich der Kallikreingehalt der Gl. submandibularis der Ratte durch Kostvariationen nicht beeinflussen (WERLE 1960, VOGEL 1962).

Die in beiden Systemen freigesetzten eigentlichen Wirksubstanzen sind die Peptidkinine Bradykinin und Lys-bradykinin (= Kallidin), die aus Kininogen I und Kininogen II durch Hydrolyse freigesetzt werden. (s. Abb. 1)

Dabei scheint das hochmolekulare Kininogen I ein Substrat für Plasma- und Drüsenkallikrein zu sein, während das niedermolekulare Kininogen II Substrat nur für Drüsenkallikrein ist (PIERCE 1976). Plasmakallikreine setzen Bradykinin frei (ROCHA et SILVA 1949, FREY 1968); Drüsenkallikreine setzen das Lys-bradykinin (= Kallidin) frei (FREY 1968, PIERCE 1961, WERLE 1961). Diese Kinine und das met-lys-bradykinin besitzen in sehr niedrigen Dosen weitreichende Aktivitäten: Vasodilatation, Kapillarpermeabilitätserhöhung und Ödembildung, Schmerzreiz bei Kontakt mit freien sensiblen Nervenendigungen, Kontraktion oder Relaxation glatter extravasaler Muskulatur (FREY 1968, WEBER 1977). In pharmakologischen Dosen steigern sie die renale Durchblutung und wirken diuretisch und natriuretisch (WEBSTER 1964, NASJLETTI 1975). Bradykinin führt zu Arteriolendilatation, andererseits jedoch zu Venolen-Konstrik-

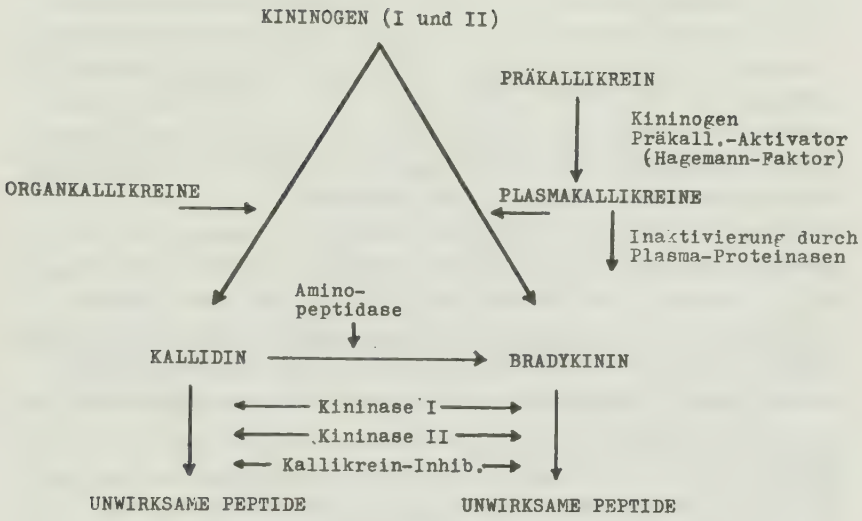


Abb. 1: Kinin-Kallikrein-System: Schematische Darstellung

tion (GUTH 1966), was möglicherweise in der differenten Wirkung der durch Bradykinin freigesetzten Prostaglandine in verschiedenen Gefäßstromgebieten begründet ist (TERRAGNO 1975). Außerdem können Kinine in sehr hohen Dosen die Konzentration von cAMP und cGMP in der Lunge steigern, wobei die Bradykininwirkung auf cAMP, nicht aber auf cGMP, durch Indometacin geblockt werden kann (STONER 1975). Klinisch bedeutsam sind veränderte Urin-Kinin-Spiegel bei Patienten mit hereditärem Angioödem, entzündlichen Gelenkerkrankungen, akuter Pankreatitis (MARGOLIUS 1979), Bartters'Syndrom (VINCI 1976), Orthostasesyndrom (STREETEN 1972), Dumping Syndrom nach Magenresektion (WONG 1974) und bei coronaren Herzkrankheiten (NEEDLEMANN 1974, 1975). Bei gesunden Personen wurden Veränderungen des freien Plasmakininspiegels in Zusammenhang mit veränderter Elektrolytzufuhr beobachtet (WONG 1975).

Die Inaktivierung der Kinine erfolgt in der Hauptsache durch Peptidbindungen hydrolysierende Enzyme, deren wichtigste als Kininase I und Kininase II bezeichnet sind (ERDÖS 1970). Kininase I (= Carboxypeptidase-N) hat ein MG von 280 000, wird in der Leber gebildet (OSHIMA 1974, 1975) und scheint vorrangig im Blut vorzukommen. Eine abnorm niedrige Plasmakininase I - Aktivität wurde bei einem familiär vorkommenden Orthostase-Syndrom beschrieben (STEETEN 1972).
Kininase II, identisch mit Angiotensin I - converting enzym (ERDÖS 1970, 1976), MG 129 000, verdient größere Beachtung, weil es neben seiner kininabbauenden Wirkung auch noch die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II bewirken kann (ERDÖS 1976). Es besteht Konkurrenz beider Systeme um das Enzym, wobei Bradykinin offenbar die bevorzugte Substanz ist.

Kininase II kommt in vielen Geweben und Zelltypen vor: Endothelzellen der Lunge (RYAN 1975), Tubulusepithelzellen der Nieren (HALL 1976), Hodengewebe (CUSHMAN 1971), im Plexuschorioideus und in der Retina (IGIC 1977). Es scheint, daß Kininase II im wesentlichen für die Reaktionen der Kinine und die Bildung von Angiotensin II im Gewebe verantwortlich ist.

Auf welche Weise nach neueren Erkenntnissen ein Antagonismus gegenüber dem Renin-Angiotensin-System bei der Senkung des Blutdruckes eine Rolle spielen könnte, soll Abbildung 2 veranschaulichen.

Nach dieser Vorstellung wären diese beiden antagonistisch wirkenden Systeme, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und das Kallikrein-Kinin-System, über die Kininase II = Converting-Enzym miteinander verknüpft. Dabei bestünde zwischen den Kininen und dem Enzym die höhere Affinität, so daß bei entsprechend erhöhter Kinin-Konzentration dem Angiotensin I der Aktivator nicht in vollem Umfang zur Verfügung steht bzw. fehlt. Zudem käme in diesem Zusammenhang dem Chlorid eine wesentliche Bedeutung zu, da sich mit zunehmender Cl-Konzentration die Affinität zwischen Kininen - Converting Enzym - Angiotensin I beständig in Richtung des Kallikrein-Kinin-Systems verschiebt.

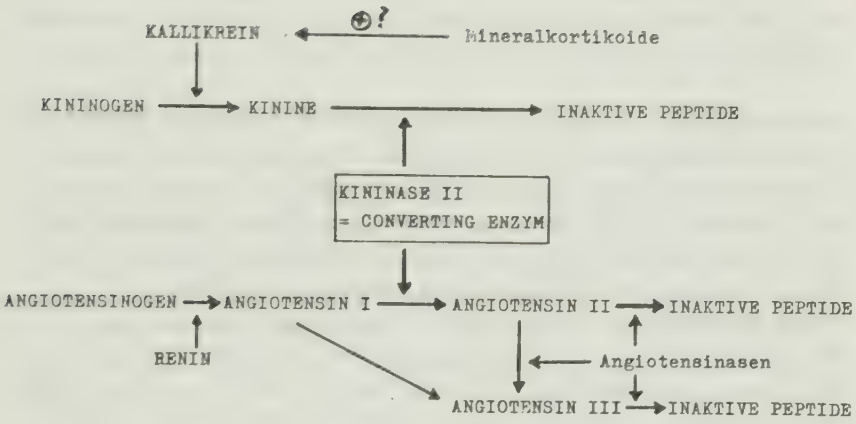


Abb. 2: Kinin-Kallikrein-System und Renin-Angiotensin-System. Schematische Darstellung (nach P.C. WEBER und K. MANN: Renale Gewebshormone. Internist 18, 529-537 (1977))

Die meisten Untersuchungen über Kallikrein bei verschiedenen Formen des arteriellen Hochdruckes wurden im Urin durchgeführt. Gegenüber Normotonen fand man erniedrigte Kallikreinaktivitäten bei primärem Hochdruck (LECHI et al. 1978, GELLER et al. 1975, MARGOLIUS et al. 1974, 1972, 1971, ELLIOT und NUZUM 1934), unveränderte oder ebenfalls erniedrigte Aktivitäten bei renovasculärem Hochdruck (MARGOLIUS et al. 1972, 1971, KEISER et al. 1976, JENNER und CROXATTO 1973, CROXATTO und SAN MARTIN 1970) und erhöhte Kallikreinspiegel bei endokrinen Hochdruckformen (M. ADDISON, Phäochromocytom, M. Cushing) (LECHI et al. 1978, MARGOLIUS et al. 1974, 1972, 1971).

Da das im Urin bestimmte Kallikrein direkt vom Nierenparenchym stammt (NUSTAD et al. 1975), betreffen die Aussagen vorwiegend Veränderungen des intrarenalen Kallikrein-Kinin-Systems unter Berücksichtigung der effektiven Nierenleistung und der Masse des noch funktionstüchtigen Nierengewebes.

Um diese Einflüsse, die gerade bei verschiedenen Hochdruckformen bedeutend sein können, auszuschalten und um weitere Informationen über das Kallikrein-Kinin-System bei Hypertonie zu erhalten, sollten extrarenale Kallikreinuntersuchungen durchgeführt werden. Es boten sich dafür die Speicheldrüsen an, da aus früheren Untersuchungen (WOTMAN et al. 1969, FREY, KRAUT, WERLE 1968) bekannt war, daß im Speichel das Kallikrein nur in aktiver Form vorliegt und daß Speicheldrüsen und Speichel relativ hohe Kallikrein-Konzentrationen aufweisen. Außerdem hatten immunhistochemische Untersuchungen von Speicheldrüsengewebe Aufschlüsse über die Lokalisation des Kallikrein innerhalb der Drüsen ergeben, und es war bekannt, daß das enzymatisch aktiv vorliegende Speicheldrüsen-Kallikrein die Fähigkeit hat, sowohl Kinin als auch Brady-Kinin zu bilden.

Bestimmungen des Kallikrein im Speichel von Ratten, wie sie bisher noch nicht durchgeführt worden waren, haben gegenüber Kallikreinbestimmungen im Urin außerdem den Vorteil, daß die Aussagekraft jener Untersuchungen limitiert sein dürfte durch die Abhängigkeit der Urin-Kallikreinausscheidung von der effektiven Nierenleistung, die, wie bereits angedeutet, gerade bei verschiedenen Hochdruckformen verändert sein kann.

Es wurden in den vorliegenden Untersuchungen also Kallikreinbestimmungen im Parotisspeichel von hypertonen und normotonen Ratten angestellt, da bislang greifbare Daten über dieses Organ-Kallikrein-Kinin-System in dieser Form nicht bekannt waren und man aufgrund früherer Untersuchungen des Kallikreins im menschlichen Speichel wichtige neue Aspekte über das Verhalten des Kallikrein-Kinin-Systems bei verschiedenen Formen der Hypertonie erwarten konnte.

Dazu wurden verschiedene Testmodelle aufgestellt:
wegen der beim Urin-Kallikrein bekannten Abhängigkeit von der Elektrolytzufuhr und wegen der pathogenetischen Beziehungen zwischen Kochsalz und Hypertonie wurde die Kallikreinaktivität bei normotonen Ratten mit und ohne 10-wöchige NaCl-Belastung untersucht; in einer weiteren Serie von Experimenten das Kallikreinverhalten bei Ratten mit spontan- bzw. experimentellem Hochdruck gegenüber Normotonen.

Es wurden dazu Kollektive mit genuinem Hochdruck (SHR Okamoto/NIH/Montreal/Ingelheim), renoparenchymalem Hochdruck (induziert durch einseitige Nierenarterienstenosierung) und DOCTMA-Salz-Hochdruck (induziert durch Heminephrektomie; NaCl-Belastung und Kortisonverabreichung) einer Kontrollgruppe von normotensiven Ratten gegenübergestellt.

METHODIK

I. TIERE UND TIERHALTUNG

Die Experimente wurden mit gleichaltrigen, etwa gleich schweren männlichen Spraque-Dawly Ratten durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte in klimatisierten Ställen (Raumtemperatur 25° C, relative Luftfeuchte 30 %, automatischer Tag/Nachtrhythmus bei künstlichem Licht), Futter (Altromin stand.) und Wasser bzw. 1 %ige Kochsalzlösung wurden ad libidum gegeben. Um tageszeitliche Rhythmusstörungen auszuschließen, wurden die Experimente täglich um etwa die gleiche Uhrzeit durchgeführt, die Tiere vorher 12 Stunden nüchtern gehalten.

Zum Versuch wurden nur solche Tiere ausgewählt, die in keiner Weise durch Unregelmäßigkeiten aufgefallen waren (Gewicht, Fell, Augen, Verhalten, Kot, Atmung).

Gleichermaßen kamen nur Versuchstiere zur Auswertung, bei denen weder während der Versuchsvorbereitung noch während der Präparation noch während der Zeit der fraktionierten Probensammlung besondere Vorfälle zu verzeichnen waren.

II. TIEREXPERIMENTELLE HOCHDRUCKMODELLE UND IHRE CHARAKTERISIERUNG

In den durchgeführten Experimenten wurde die Kallikreinaktivität im Parotisspeichel von Ratten mit Bluthochdruck verschiedener Ätiologie untereinander und gegenüber normotonen Ratten verglichen. Außerdem wurde das Kallikreinverhalten nach oraler NaCl-Belastung untersucht.

Bei den hypertensiven Ratten wurden drei Gruppen mit Bluthochdruck verschiedener Ätiologie und Pathogenese getestet: Spontanhypertensive Ratten, Ratten mit renovasculärem Hochdruck, Ratten mit D.O.C.T.M.A.-SALZ Hochdruck.

Bei den normotonen Ratten handelte es sich um ein Kollektiv aus Spraque-Dawly Ratten, die nach entsprechender Vorbereitung als Kontrollen den Ratten mit renovasculärem und mit

D.O.C.T.M.A.-SALZ Hochdruck gegenüberstanden, und aus speziellen Kontrolltieren zu den spontan hypertensiven Ratten.

Um den Einfluß einer mehrwöchigen oralen NaCl-Belastung zu erfassen, was hinsichtlich der bei den D.O.C.T.M.A.-SALZ Hochdrucktieren durchgeführten Kochsalzbelastung von besonderem Interesse war, wurde eine weitere Gruppe von Spraque-Dawly Ratten über einen Zeitraum von 10 Wochen mit 1 %iger Kochsalzlösung getränkt, um dann die Kallikreinaktivität des Parotisspeichels gegenüber einem mit normalem Wasser getränkten Kollektiv zu bestimmen.

1. Orale NaCl-Belastung und Kontrolltiere

Nach einer Eingewöhnungszeit von 4 Tagen erfolgte der Start der Experimente mit 13 bis 14 Wochen alten, 250 bis 300 g schweren männlichen Spraque-Dawly Ratten als Kontrolltieren. Gleichzeitig wurde bei anderen männlichen Spraque-Dawly Ratten im Alter von 3 Wochen mit der oralen NaCl-Belastung begonnen. Dazu bekamen diese Ratten ebenfalls nach einer Eingewöhnungszeit von 4 Tagen neben normaler Fütterung mit ALTROMIN STANDARD DIÄT 1 %ige Wasser/Kochsalz-Lösung ad libidum. Das Gewicht der Tiere am Versuchstag lag zwischen 230 bis 300 g bei einem Lebensalter von 13 bis 14 Wochen.

2. Spontanhypertensive Ratten (SH-Ratten) und Kontroll-Tiere

Bei diesen sogenannten SH-Ratten mit genuiner, essentieller, arterieller Hypertonie handelt es sich um einen von OKAMOTO und AOKI (1963) durch selektionierte Inzucht erzeugten Rattenstamm, dessen Ursprungsrasse Wistar-Ratten waren. Die Stammbezeichnung ist SHR OKAMOTO / NIH / MONTREAL / INGELHEIM. Als Kontrolltiere dienten Ratten des Wistar-Kyoto Stammes, da die sogenannten OKAMOTO-AOKI-Ratten von Wistar Ratten des zentralen Tierlabors der Kyoto Universität abstammen (Stammbezeichnung: TAC: WKY/NBR) und jene Rasse somit aufgrund ih-

rer engen genetischen Verwandtschaft als geeignetste Kontrolle gelten kann.

Bei den SH-Ratten entwickelt sich im Alter von 4 bis 8 Wochen ein Bluthochdruck. Die Pathogenese dieser Hypertonie ist trotz vieler Untersuchungen noch unklar. Diskutiert wird eine entscheidende Beteiligung des ZNS, insbesondere des sympathischen Nervensystems.

3. Renovasculär-hypertone Ratten (RV-Ratten) und Kontroll-Tiere

Bei diesen Tieren wurde, ausgehend von normotonen männlichen Spraque-Dawly Ratten, durch unilaterale Nierenarterienstenosierung mittels Silberclip im sogenannten GOLDBLATT-Mechanismus experimentell ein Hochdruck erzeugt (LEENEN 1971). Es wurde dazu bei 3 bis 4 Wochen alten männlichen Spraque-Dawly Ratten mit einem Gewicht von 80 bis 100 g in Kurznarkose mit EVIPAN - Na ^{R} (Dosis 100 mg/kg Körpergewicht) die rechte Niere durch einen Paravertebralschnitt (Länge etwa 1,5 cm) in Höhe der unteren BWS freigelegt. Lösung der Arterie aus dem Gefäß-Nervenstiel der Niere und sorgfältiges, stumpfes Freipräparieren aus dem umgebenden Bindegewebe schloß sich an. Über die Arterie konnte dann ein Silberdraht-Clip mit einer leeren Weite von ca. 0,2 mm geschoben werden (Spezialanfertigung Labor Dr. Schöllkens, Pharma Höchst, hergestellt aus DECUSA-Silberdraht, Durchmesser 1,5 mm). (Siehe Abb. 3)

Dadurch blieb zur arteriellen Versorgung der Niere eine stenosierte Nierenarterie mit einer Restöffnung von 0,2 mm abzüglich der doppelten Dicke der Nierenarterienwand. Reposition der Niere und schichtweiser Verschluß der Operationswunde beschlossen den Eingriff. Die Tiere waren in der Regel 5 bis 10 Minuten nach Beendigung des Eingriffs wieder mobil.

Stallhaltung unter den bekannten Konditionen, Tränkung mit Leitungswasser.

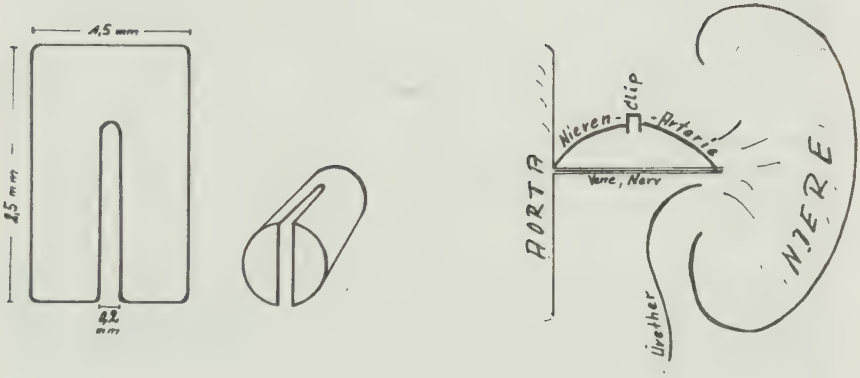


Abb. 3: Schematische Darstellung des Nierenarterienclips und der anatomischen Verhältnisse

Auf diese Weise entwickelte sich bei den Ratten eine Hypertonie, die ihr Maximum mit zum Teil malignen Blutdruckwerten um die 10. Woche nach Start der Experimente erreichte (sog. GOLDBLATT-HOCHDRUCK oder DROSSELUNGS-HOCHDRUCK).

> 1934 hatte GOLDBLATT mit diesem Verfahren im klassischen Tierexperiment durch ein- oder beidseitige Nierenarterieneinengung (partielle Drosselung) eine Blutdruckerhöhung auf pathologische Werte erzeugen können.

Bei dieser Form der Hypertonie kommt es zumindest im Anfangsstadium nachweislich zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die primär neben anderen Faktoren

eine Erhöhung des Blutdruckes bewirkt, gleichzeitig aber auch eine Antikörperbildung gegen Angiotensin II induziert, was mit einer Reduktion des Hochdrucks korreliert (SIEGENTHALER, W. 1973). Durch die individuelle Schwankung der Fähigkeit zur AK-Bildung erscheint auch das verschiedene Ausmaß der Blutdruckerhöhung bei verschiedenen Tieren mit experimentellem renovasculärem Hochdruck erklärbar.

Eine endgültige Aussage darüber, ob das Renin-Angiotensin System die Ursache der renovasculären Hypertonie darstellt, oder ob es nur im Anfangsstadium dieser Hypertonieform stimuliert wird, um dabei humorale, neurale und Elektrolytveränderungen auszulösen, die im späteren Krankheitsstadium den Hypertonus auch ohne Mitwirkung von Renin-Angiotensin aufrechterhalten, ist derzeit trotz vieler tierexperimenteller und klinischer Untersuchungen allerdings noch nicht möglich (SIEGENTHALER, W. 1973).

Für die Kontrollexperimente zu den renovasculären Hochdruck-Ratten wurden gleichaltrige, gleichschwere, männliche Spraque-Dawly Ratten gleicher Generation genommen. Diese Tiere waren nach dem beschriebenen Verfahren scheinoperiert worden, d.h. bei vorliegendem Operationssitus wurde lediglich eine mechanische Manipulation des Nierengefäßstiels durchgeführt, ohne einen Arterien-Clip einzubringen. Ansonsten galten für beide Tiergruppen gleiche äußere Bedingungen.

4. D.O.C.T.M.A. (Desoxycorticosteron-tri-methyl-acetat) - SALZ - Hochdruck-Ratten (DH-Ratten) und Kontroll-Tiere

Bei den als DH-Ratten bezeichneten Tieren wurde, modifiziert nach MÖHRING, J. et al. (1976), durch Salzwassergabe und Kortisonverabreichung ein Bluthochdruck erzeugt.

Dazu wurden an 5 Wochen alten, 130 bis 150 g schweren, männlichen Spraque-Dawly Ratten nach einer Eingewöhnungszeit von 4 Tagen unilateral rechtsseitige Nephrektomien durchgeführt:

Kurznarkose mit EVIPAN - Na^{R} (100 mg/kg Körpergewicht), Paravertebralschnitt, Darstellen der rechten Niere, Quetschung und Durchtrennung des Gefäßstieles zwischen doppelter Ligatur, Herausnahme der Niere unter Belassung der Nierenkapsel mit der Nebenniere, schichtweiser Wundverschluß.

Nach der Operation bekamen die Tiere neben der üblichen Fütterung mit ALTROMIN stand. nur noch 1 %ige NaCl-Lösung zu trinken und wurden zwei Tage nach der Operation erstmals mit einem Corticoid gespritzt. Es wurde D.O.C.T.M.A. (= Desoxycocorticosteron-trimethyl-acetat; Handelsname PERCORTEN-M^{R}) verwendet. Jedes Tier erhielt 1/2 Ampulle = 0,5 ml Lösung = 12,5 mg D.O.C.T.M.A. parenteral.

Diese Spritzenbehandlung wurde in wöchentlichen Abständen über 9 Wochen durchgeführt. Dabei wurden die ersten 6 Injektionen i.m. in die Oberschenkelmuskulatur, abwechselnd rechts und links, gegeben, die restlichen Injektionen wurden s.c. paravertebral unter die Rückenhaut verabreicht.

Wöchentlich wurden Gewicht und Aspekt (Fell, Augen, Verhalten) der Tiere kontrolliert. Daraus ergaben sich Hinweise auf einen sich entwickelnden Hochdruck (struppiges, gelblich verfärbtes Fell, leicht hervortretende Augenbulbi, trägere Körperbewegungen, verlangsamte Gewichtszunahme bzw. Gewichtsabnahme, siehe dazu auch MÖRING 1976).

Auf eine plethysmographische Blutdruckmessung während dieser 9 Wochen wurde aus Gründen der physischen Belastung der Tiere und der dadurch bedingten relativ hohen Sterberate während oder kurz nach der Messung verzichtet. Die Hochdrucktiere wurden unmittelbar vor dem Versuch durch direkte, blutige Messung ihres Druckes selektiert.

Unter der beschriebenen Behandlung kam es bei den Ratten innerhalb von 8 bis 9 Wochen zu einer Blutdruckerhöhung auf durchschnittlich 170 bis 210 mmHg (blutige Messung an der A. femoralis mittels geeichter Quecksilbersäule).

Laborchemisch lassen sich bei dieser Hochdruckform nach MÖHRING (1976) Steigerungen der Serumosmolarität, des Serum-Natrium und der Harnkonzentration feststellen. In der ver-

bleibenden Niere kommt es zu einer malignen Nephrosklerose. Die Plasmakonzentration des Vasopressin steigt im Vergleich zu Normaltieren um das 10fache. Entsprechend führen i.v.-Injektionen spezifischer Vasopressin-Inhibitoren zu signifikanten Blutdrucksenkungen. Injektionen von Angiotensin I oder Angiotensin II Inhibitoren zeigen keinen Effekt auf das Blutdruckverhalten (MÖHRING, J. 1976). Daraus ist zu schließen, daß bei der Pathogenese des D.O.C.T.M.A.-SALZ Hochdruckes das Vasopressin eine ähnliche Rolle spielt wie beim renovasculären Hochdruck das Renin-Angiotensin System (MÖHRING, J. 1976).

Bei einer Gruppe von Tieren, die den DH-Ratten hinsichtlich Rasse, Alter, Geschlecht, Gewicht und Generation entsprachen und die jenen als Kontrollen gegenübergestellt werden sollten, wurden folgende experimentelle Manipulationen vorgenommen:

Nach 4 Tagen Eingewöhnungszeit erfolgte Scheinoperation durch rechtsseitigen Paravertebralschnitt in EVIPAN - Na Kurznarkose. Freilegen der rechten Niere, mechanische Alteration des Organs, Reposition, Wundverschluß.

Postoperativ Tränken der Tiere mit Leitungswasser ad libidum, Fütterung mit ALTROMIN STANDARD DIÄT, wöchentlich Injektionen mit physiologischer Kochsalzlösung entsprechend dem Applikationsmodus bei den DH-Ratten. Neun Wochen nach Beginn des Experimentes erfolgte die Bestimmung der Kallikreinaktivität im Parotisspeichel.

III. SPEICHELKOLLEKTION

Die Gewinnung von Parotisspeichel von Ratten erfolgte entsprechend der 1980 beschriebenen Methode (G. SCHMID, N. NEFF et al. 1980). Speichelproben wurden in 10-minütigen Fraktionen gesammelt und das Speichelvolumen bestimmt. Es kam dabei entschieden darauf an, den Einfluß äußerer Bedingungen zu erkennen und zu kontrollieren.

So konnten verschiedene Verbesserungen, vornehmlich in den Bereichen der tageszeitlichen Rhythmik mit ihren physiologisch-biologischen Schwankungen, der Raum- und Umgebungstemperatur während des Experimentes, der Behandlung und Weiterverarbeitung der Speichelproben nach deren Gewinnung und der technischen Verfahrensweise bei der BAEE-esterase Bestimmung erreicht werden.

Aus diesen Gründen wurde jedes Tier vor Beginn des Versuches über 12 Stunden nüchtern gehalten. Um tageszeitliche Rhythmusstörungen zu eliminieren, wurden alle Versuche und Bestimmungen zur annähernd gleichen Tagesstunde durchgeführt.

Die Tierexperimente wurden in einem klimatisierten Raum (Raumtemperatur 25° C, relative Luftfeuchte 30 %), in welchem ein konstanter, monotoner Geräuschpegel in Flüsterlautstärke herrschte, durchgeführt. Dadurch wurden die Geräusche, die durch Umhergehen, Hantieren mit Instrumenten und dergleichen auftraten, unterschwellig und konnten keine Schreckreaktionen des narkotisierten Tieres hervorrufen. Auch wurde die Körperaußentemperatur des Tieres konstant zwischen 35 und 37° C gehalten (siehe auch Anhang).

Voraussetzung zur fraktionierten Speichelsammlung war die operative Vorbereitung und die Präparation des Versuchstieres. Dazu wurden die Ratten mit INACTIN^{R} intraperitoneal (Dosis 70 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert, auf einem auf 37° C vorgewärmten Operationstischchen gelagert und dann wurde unter Zeitkontrolle mit der eigentlichen Präparation des Versuchstieres begonnen.

Tracheotomie:
Gerader medianer Hautschnitt vom Manubrium sterni bis zum Schildknorpel. Freilegen der geraden Halsmuskulatur und der Thyreoidea. Unblutige Längsspaltung der geraden Halsmuskeln unterhalb der Schilddrüse. Freipräparieren der Trachea und Eröffnung in halber Circumferenz zwischen zwei Haltefäden. Einbringen eines als Tubus dienenden Perfusionsschlauches von ca. 3 cm Länge und 1,5 cm äußerem Durchmesser.
Proximale Unterbindung der Trachea, Fixieren des Tubus. Die regelrechte Atmung des Tieres wurde dadurch angezeigt, daß der durchsichtige Tubus während der Exspiration deutlich beschlug. Dauer der Tracheotomie 2 bis 3

Minuten. Wichtig war schonendes Vorgehen und Vermeidung aller unnötigen Manipulationen an der Trachea, um eine unnötige Anregung der Schleimsekretion zu vermeiden.

Venenkatheter, Blutdruckmessung:
Freilegen der Vasa femoralia dextra. Einbringen eines Infusionsschlauches zuerst in die Arterie (PVC-Schlauch 0,4 x 0,95 mm). Gewinnung von 1 ml Blut zur Elektrolytbestimmung, Anschluß an eine nivellierte Quecksilbersäule zur Blutdruckmessung. Mediatorflüssigkeit zwischen Blutsäule und Quecksilbersäule war eine Ringer/Liquemin = 20 : 1 Lösung, wodurch die Gerinnung des Blutes im System verhindert wurde. In gleicher Weise Herstellen eines venösen Zuganges und Anschluß der Ringer-Infusion. Dauer der Gefäßkatheterisierung ca. 5 Minuten.

Katheterisierung des Ductus paroticus:

In den Grundzügen wurde das Verfahren nach F.O. STÄHLIN et al. (1978) mit einigen Modifikationen durchgeführt: Selbstgefertigte Katheter, hergestellt aus einem PE-Schlauch von 1 mm Innendurchmesser durch Erhitzen und kapillarartiges Ausziehen über der Sparflamme eines Bunsenbrenners, wodurch man je nach Technik bis 1/10 mm starke Röhrchen erhielt, mußten in beide Ausführungsgänge der Ohrspeicheldrüsen eingebracht werden.

Zuvor war beim Spreizen des Mauls der Ratte darauf zu achten, daß der Sehnenanteil des Musculus masseter deutlich durch die Mundschleimhaut hindurch sichtbar war und daß die Öffnung des Parotisausführungsganges vor, d.h. lippenwärts dieser Sehnenplatte lag. Die richtige Lagerung und die richtige Sperrung des Mauls waren ganz wesentlich für das Gelingen der Katheterisierung; ebenso die Wahl eines von Fall zu Fall passenden Katheters.

Nachdem man sich die Öffnung des Parotisausführungsganges durch Ausmassieren eines Speicheltropfens, der zudem durch seine lupenartig vergrößernde Wirkung jene gut sichtbar machte, dargestellt hatte, wurde der an der Spitze angeschrägte Katheter von hinten oben in die Öffnung geschoben. War der Katheter 2 bis 3 mm weit eingedrungen, mußte, der Krümmung des Ausführungsganges um die Massetersehne herum folgend, die Richtung nach hinten unten erreicht werden. Nach einer Wegstrecke von etwa 1 cm konnte die Inkanalisation des Ductus paroticus ins Stocken geraten, dann nämlich, wenn die Kathe-

terspitze jene Stelle erreicht hatte, wo der Ausführungsgang in eine gemeinsame, bindegewebige Hülle mit dem Nervus facialis einmündet und dabei einen leichten Knick macht. Zu überwinden war diese Stelle am ehesten, indem man durch Anziehen des lateralen Mundwinkels nach vorne, d.h. von der Drüse weg, diesen Knick des Ausführungsganges streckte, oder indem man den Katheter, mehrfach um seine Längsachse drehend, versuchte weiterzuschieben. War diese Enge passiert, dann wurde der Katheter noch eine geringe Wegstrecke weitergeschoben.
Die Notwendigkeit einer Mindesteinführungslänge bestand nicht. Selbst wenn es nicht gelang, den zweiten Knick im retrograden Verlauf des Ausführungsganges zu überwinden, konnte bei vollständiger Suffizienz der Lage des Katheters mit der Speichelsammlung begonnen werden. Keinesfalls durfte in irgend einer Phase der Katheterisierung gewaltsam vorgegangen werden, da sonst mit großer Wahrscheinlichkeit der angespitzte Katheter die Wand des Ductus paroticus durchstoßen hätte.

> Bei Eintreten eines solchen Falles hätte noch die Möglichkeit bestanden, den Ausführungsgang von außen freizupräparieren und den Katheter unter Sicht weiterzuführen. Dieses Verfahren erforderte aber zuviel Zeit und kam aus diesem Grund nicht zur Anwendung.

Lagen beide Katheter (Dauer ca. 5 bis 7 Minuten), so konnte sofort mit der PILOCARPIN-Stimulation begonnen werden.

Die Stimulation der Speichelsekretion erfolgte durch Applikation von

- PILOCARPIN^{R} 0,35 ml s.c. als initiales Depot
- PILOCARPIN^{R} 0,14 ml/h s.c. als Infusion.

Dabei wurden kontralaterale Applikationsorte an der Bauchwand in Höhe der Nabelregion gewählt, um die momentan ohnehin überlastete Resorptionskapazität am Ort der PILOCARPIN^{R} - Injektion nicht durch eine zusätzliche Infusion noch mehr zu überfordern und um ein sofortiges Ansprechen der Infusion zu gewährleisten.

Die vermehrte Streßbelastung der Tiere durch den zweiten Einstich hatte sich als recht gering erwiesen, entsprechende Versuche hatten gezeigt, daß sich Puls und Blutdruck nicht mehr veränderten als bei nur einem Einstich.

Fraktionierte Probensammlung:

Die Speichelgewinnung wurde 20 Minuten nach PILOCARPIN^{R} - Applikation gestartet und fraktioniert durchgeführt.

> Die Gründe für den verzögerten Beginn der Speichelsammlung waren die hohe Viskosität des anfangs sehr mukösen Speichels, die Möglichkeit der Beruhigung des Tieres nach den operativen Manipulationen, die Nutzung der Zeit bei etwaigen technischen Unregelmäßigkeiten (verstopfte Katheter etc.), die Blutdruckschwankungen unmittelbar nach PILOCARPIN^{R}- Verabreichung und schließlich die auffallend hohen BAEE-esterasewerte im erstgewonnenen Speichel.

Es wurde der Speichel aus beiden Parotis-Drüsen über jeweils 10 Minuten pro Probe gesammelt (f r a k t i o n i e r t e Probensammlung), nachdem die Katheter mit speziell veränderten 0,2 ml Pipetten verbunden worden waren (F.O. STÄHLIN 1978), so daß der sezernierte Speichel sich in diesen in Eiswasser gekühlten Pipetten sammeln konnte. Die Pipetten waren in eine leicht ansteigende Lage gebracht, damit die durch Sekretionsdruck und durch Adhäsion in ihnen kletternde Speichelsäule nicht zerfiel. Nach 10 Minuten mußten die Pipetten in ein frisches, vorgekühltes EPPENDORF-Gefäß ausgeblasen und sofort zur weiteren Speichelsammlung mit den Kathetern wieder verbunden werden. Der Speichel wurde ausgemessen und bis zur Bestimmung der Kallikreinaktivität, die fünf Stunden nach Entnahme der Probe durchgeführt wurde, in Eiswasser aufbewahrt. Auf diese Weise wurden pro Experiment 12 Proben gesammelt.

Zu jeder Fraktion wurden Blutdruck und Puls gemessen. Ein Abbruch der Speichelsammlung vor der 120. Minute war angezeigt, wenn die Flußrate unter 0,15 ml/10 Min. absank, da dann die aufgefangene Speichelmenge zur Bestimmung der Kallikreinaktivität rein technisch nicht mehr ausreichte.

IV. KALLIKREINAKTIVITÄTSMESSUNG UND -BERECHNUNG

1. Theoretische Grundlagen

Von den verschiedenen Möglichkeiten (FREY, KRAUT, WERLE 1968) wurde die enzymatische Kallikreinbestimmung durch Messung der Spaltungsgeschwindigkeit von BAEE (benzoyl-L-arginin-äthylester) und deren indirekte photometrische Bestimmung bei 340 nm angewendet.

Prinzip der BAEE-esterolyse:

Neben seiner biologischen Aktivität besitzt das Kallikrein auch eine esterolytische Aktivität vor allem gegen die Ester des Arginin. Diese esterolytische Aktivität entspricht der kininbildenden Aktivität des Kallikrein (EICHNER 1976, TRAUTSCHOLD, E. WERLE, G. SCHWEITZER 1970). Aufgrund dessen läßt sich mit BAEE (Benzoyl-L-arginin-äthylester) und in einem weiteren Reaktionsschritt mit NADH (Nicotin-amidadenin-dinucleotid) die Aktivität von BAEE-esterase in einer Substanz oder in einem Sekret bestimmen.

Es laufen folgende Reaktionen ab:

I. BAEE $\xleftarrow{\text{Kallikrein}}$ Benzoyl-L-arginin + Äthanol

II. Äthanol + NAD^+ $\xleftarrow{\text{ADH}}$ Acetaldehyd + NAD + H^+

Das Gleichgewicht beider Reaktionen liegt weit auf seiten der Spaltprodukte. Die pro Zeiteinheit umgesetzte Menge Äthanol, gemessen an der Zunahme der NAD-Extinktion bei 340 nm, ist ein Maß für die Kallikreinaktivität. Dabei gilt, daß die Extinktionsänderung ΔE/min., multipliziert mit dem Faktor 4823, die Volumenaktivität in mU/ml ergibt (TRAUTSCHOLD 1961) (weiteres siehe Abschnitt Berechnung).

2. Materialien, Herstellung der Lösungen bzw. Suspensionen

Folgende Reagentien waren zur Herstellung der für die enzymatische Kallikreinbestimmung notwendigen Lösungen bzw. Suspensionen notwendig:

Reagentien: Tetra-Natrium-diphosphat · 10 H_2O
Semicarbazid-hydrochlorid
Glycin
ß-NAD (freie Säure)
Benzoyl-L-arginin-äthylester (BAEE)
Alkoholdehydrogenase (ADH)
Natronlauge 2n
Ammoniumsulfat 2,4 M

Lösungen und Suspensionen:

Pyrophosphat-semicarbazid-glycin-Puffer (pH 8,7):

8,9 g 4-Natrium-diphosphat · 10 H_2O plus 2,2 g Semicarbazid-hydrochlorid plus 0,4 g Glycin wurden in Aqua bidest gelöst, mit 2n NaOH auf pH 8,7 eingestellt und mit Aqua bidest, ad 100 ml Gesamtvolumen gefüllt.

Die Haltbarkeit des Puffers betrug bei 25° C ca. eine Woche.

Bei der Herstellung der Pufferlösung war zu beachten:

> Die genau abgewogenen Substanzmengen mußten in ca. 80 bis 85 ml Aqua bidest gelöst werden. Dieses hohe Ansatzvolumen war notwendig, da, wenn man versuchte, die oben angegebene Substanzmenge in einem geringeren Volumen Aqua bidest zu lösen, dies zwar gelang, sobald jedoch mit der Pufferung durch NaOH begonnen wurde, bei pH 7,5 bis 8,0 die Substanzen schneegestöberartig wieder ausfielen und außer durch Temperaturerhöhung oder Zugabe von mehr Lösungsmittel nicht mehr in Lösung zu bringen waren.
> Nach Lösung der Substanzen erfolgt bei 25° C unter Verwendung eines Rührers die Pufferung der Lösung über einen Zeitraum von mehreren Stunden auf einen pH von 8,7. Danach wurde bis zum Gesamtvolumen = 100 ml mit Aqua bidest aufgefüllt.

NAD-LÖSUNG:

60 mg NAD wurden in 3 ml Aqua bidest gelöst (ca. 30 mM NAD). Die Haltbarkeit der Lösung betrug etwa 1 Woche.

BAEE-LÖSUNG:

34,8 mg BAEE (L-Form) wurden in 15 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Die Haltbarkeit betrug 1 bis 2 Tage bei einer Temperatur von 0 bis 4° C.

Da das Gesamtvolumen von 15 ml nach 28 bis 29 Kallikrein-bestimmungsansätzen verbraucht war, die Herstellung der BAEE-Lösung relativ schnell und unaufwendig vonstatten ging, wurde für jeden Versuch eine frische Esterlösung angesetzt.

ADH-SUSPENSION: (30 mg Enzymprotein pro ml)
Die 100 mg Enzymprotein (Originalverpackung) wurden in 3,4 ml einer 2,4 M Ammoniumsulfat-Lösung gelöst. Die Haltbarkeit betrug einige Monate. Die ADH-Lösung war ausschließlich in Kälte aufzubewahren; für die Zeit der Entnahme von Teilvolumina bot sich die Aufbewahrung in Eiswasser an.

AMONIUMSULFAT-LÖSUNG: (2,4 M)
1,3214 g Amoniumsulfat (MG 132,14) wurden in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

NATRONLAUGE:
20 g NaOH-Plätzchen (MG 40) gelöst in 250 ml Aqua bidest ergaben 2 n Natronlauge.

3. Photometrische Aktivitätsmessung

Wie bereits erwähnt, wurden die Speichelproben nach der Entnahme in Eiswasser gekühlt aufbewahrt und noch am selben Tag, fünf Stunden nach der Gewinnung, die Kallikreinaktivität bestimmt.

Zur photometrischen Bestimmung der Kallikreinaktivität im Parotisspeichel war es aus meßtechnischen Gründen notwendig, die eisgekühlten Speichelproben 1 : 11 mit Aqua bidest zu verdünnen (siehe Abschnitt "Berechnungen": ΔE/min nicht größer als 0,030).

Der Meßbeginn erfolgte 5 Stunden nach Entnahme der ersten Speichelprobe.

> Da bei der Probensammlung im 10-Minuten-Rhythmus vorgegangen worden war und auch bei der Bestimmung der Kallikreinaktivität am Photometer die einzelnen Probenmeßzeiten 10 Minuten dauerten, konnte die zeitliche Konkordanz von Probe zu Probe gewahrt werden, d.h., daß für jede Probe eines laufenden Versuches die gleichen Zeitabstände vom Moment der Entnahme bis zum Augenblick der Messung gewährleistet waren.

Als Bestimmungsansatz wurde ins Reagenzglas, bzw. in die Küvette pipettiert (angegeben sind die Mengen im Endvolumen von 3,0 ml):

2,3 ml Pufferlösung
0,1 ml NAD-Lösung
0,02 ml ADH-Suspension
0,5 ml BAEE-Lösung

Zu diesem Bestimmungsansatz wurden 0,1 ml der 1 : 11 verdünnten, eiswassergekühlten Speichelprobe hinzupipettiert.

Zum Leerwertansatz wurden als Volumenausgleich 0,1 ml Aqua bidest zugegeben.

Die technische Durchführung der Kallikreinbestimmung am Photometer erfolgte in Anlehnung an TRAUTSCHOLD und WERLE (1963) unter Berücksichtigung der Modifikationen durch H. EICHNER et al. (1976), sowie durch WORTHINGTON und CUSCHIERI (1974).

Der Bestimmungsansatz (2,3 ml Pufferlösung, 0,1 ml NAD-Lösung, 0,02 ml ADH-Suspension, 0,5 ml BAEE-Lösung) wurde zunächst bei 25° C fünf Minuten inkubiert und dann nach Zugabe von 0,01 ml der verdünnten Speichelproben nochmals für drei Minuten. Nach acht Minuten Gesamt-Inkubationszeit wurde E_1 gegen den auf Null abgeglichenen Leerwert (= Bestimmungsansatz plus 0,01 ml Aqua bidest) abgelesen.

Während der achtminütigen Inkubationszeit hatte die anfangs relativ rasche Extinktionszunahme des Bestimmungsansatzes bzw. des Leerwertes, deren Ursache noch nicht eindeutig geklärt ist (H. EICHNER et al. 1976), ihr Maximum überschritten. So wurde von EICHNER et al. (1976) berichtet, daß, wenn die erste Ablesung der Extinktion sieben Minuten nach dem Mischen der Reagentien vorgenommen wurde, kein Unterschied zu den Ergebnissen einer von WORTHINGTON und CUSCHIERI (1974) geforderten Variante des Testes festgestellt hatte werden können. WORTHINGTON und CUSCHIERI (1974) hatten im Gegensatz zu TRAUTSCHOLD und WERLE (1963) gefordert, die Reagentien vorzumischen und 15 Minuten lang zu inkubieren, um die anfangs auftretende, relativ schnelle Zunahme der Extinktion des Leerwertes von der eigentlichen Messung auszuschließen.

Zehn Minuten nach Meßbeginn wurde E_2 der Probe abgelesen und gleichzeitig die Extinktionszunahme des Leerwertes E_L registriert. Aus den vorliegenden drei Extinktionswerten wurde die Extinktionsänderung der Probe durch Subtraktion ermittelt:

$$\Delta E/min = \frac{E_2 - E_1 - E_L}{10}$$

4. Berechnung der Enzymaktivität

Die Berechnung der BAEE-esterase Aktivität erfolgte dann ausgehend von der NAD-Extinktionszunahme nach dem LAMBERT-BEERSCHEN GESETZ.

$$\text{I.)} \qquad C = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} \quad \left[\mu\text{Mol/ml}\right]$$

Bei Änderung der Extinktion und zur Ermittlung der Aktivität im Küvettenvolumen geht das Verhältnis Testvolumen (V_T) zu Probevolumen (V_P) in die Formel ein.

$$\text{II.)} \qquad C = \frac{\Delta E \cdot V_T}{\varepsilon \cdot d \cdot V_P} \left[\mu\text{Mol/ml}\right]$$

E = Extinktionsänderung pro Zeit
ε = Extinktionskoeffizient
d = Schichtdicke
V_T = Testvolumen, = vorinkubiertes Reagenzgemisch
V_P = Probevolumen, die Menge des dem Testvolumen zugesetzten Speichels

Bei Messung von Enzymaktivitäten im Volumen (= Geschwindigkeit eines Substratumsatzes) wird diese Gleichung im Sinne der Ermittlung der Volumenaktivität umgeformt. Es geht ein Zeitfaktor in die Gleichung ein:

$$\text{III.)} \quad \text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\dfrac{E \cdot V_T}{\varepsilon \cdot d \cdot V_P}}{\Delta t} \quad \left[\frac{\mu\text{Mol}}{\text{ml}} \cdot \text{min}\right]$$

oder:

$$\text{IV.)} \quad \text{Volumenaktivität} = \frac{1000 \cdot V_T}{\varepsilon \cdot d \cdot V_P} \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \left[\text{U/l}\right]$$

Diese Formel läßt sich vereinfachen, wenn man aus dem Komplex $\frac{1000\ V_T}{\varepsilon \cdot d \cdot V_P}$ den Faktor errechnet, der dann bei gleicher Wellenlänge als Konstante mit der Variablen $\frac{\Delta E}{\Delta t}$ zu mulitplizieren ist. Dieser Faktor hat bei einer Wellenlänge von 340 nm den Wert 4823 (TRAUTSCHOLD, WERLE, SCHWEITZER 1970).

Also:

V.) $$\text{Volumenaktivität} = 4823 \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \left[\frac{U}{l}\right] \text{oder} \left[\frac{mU}{ml}\right]$$

Da man es bei dieser Berechnung aber mit der Bestimmung einer Esteraseaktivität zu tun hatte und die Speichelsekretion als aktive Drüsenleistung zu verstehen ist, so daß das Maß der Esteraseaktivität in der einzelnen Probe auch abhängig ist vom Maß der Speichelsekretion, mußte die Menge des pro Zeiteinheit sezernierten Speichels in die Berechnung der Aktivität der BAEE-Esterase einbezogen werden.

Dies geschah unter Berücksichtigung der Speichelmenge, die im Zeitraum von 10 Minuten sezerniert wurde und als Flußrate (ml/min) mit dem Ergebnis der in Formel V errechneten Volumenaktivität multipliziert wurde.

Dadurch änderte sich die Bezeichnung der Ergebnisse, und es wurde aus der Volumenaktivität in mU/ml eine Enzymaktivität in mU/min.

VI.) $$\text{BAEE-esterase Aktivität} = 4823 \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{\text{Speichelvol.}}{\text{min.}} \left[\frac{mU}{min}\right]$$

ERGEBNISSE

In der Versuchsreihe mit oraler NaCl-Belastung über einen Zeitraum von 10 Wochen wurden insgesamt 12 Experimente ausgewertet (5 Kontrolltiere und 7 NaCl-belastete Tiere).

In der weiteren Experimentenreihe der BAEE-esterase (Kallikrein) - Bestimmung bei verschiedenen Hochdruckmodellen mit entsprechenden Kontrollen wurden die Messungen bei 41 Ratten durchgeführt.

Es handelte sich dabei um

- 11 Ratten mit normalem Blutdruck als Kontrolltiere, durchschnittlich RR 110 - 130 mmHg,
- 8 Ratten mit renovasculärem Hochdruck, durchschnittlich RR 165 - 185 mmHg,
- 11 Ratten mit D.O.C.T.M.A.-SALZ Hochdruck, durchschnittlich RR 170 - 200 mmHg,
- 11 Ratten mit genuinem, essentiellem oder spontanem Hochdruck, durchschnittlich RR 160 - 180 mmHg.

Die Experimente wurden im Alter von 13 - 15 Wochen durchgeführt. Die Lebend-Körpergewichte lagen bei 270 $\pm$ 40 g.

Neben der BAEE-esterase-Aktivitätsbestimmung wurden gemessen bzw. bestimmt: Blutdruck (quantitativ und qualitativ), Speichelsekretion (quantitativ und qualitativ), Serum-Natrium- und Serum-Kalium - Konzentration, sowie Na- und K-Konzentration im Parotisspeichel.

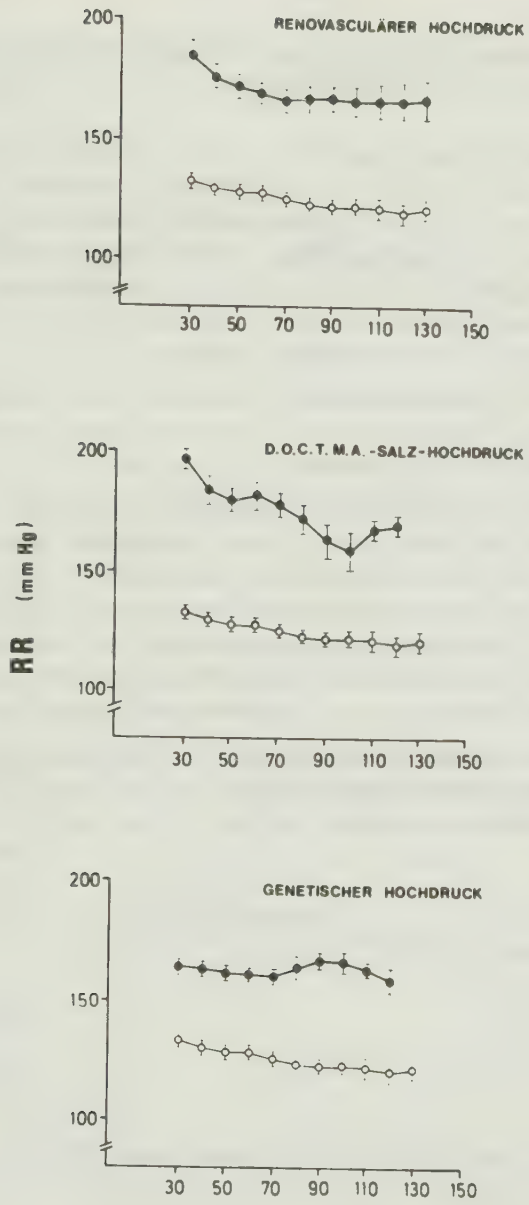
I. BLUTDRUCKHÖHE UND -VERHALTEN BEI VERSCHIEDENEN HYPERTONIEFORMEN UND KONTROLLEN

Bei den normotensiven Kontrolltieren wurden durchschnittliche Blutdrucke zwischen 110 bis 130 mmHg gemessen. In der Mittelwertskurve über die gesamte Versuchsdauer war nach anfänglichen Blutdruckwerten um 133 mmHg ein konstanter, leichter Rückgang auf 120 mmHg in der 130. Minute zu verzeichnen.
Hinsichtlich der persistenten Höhe des Blutdruckes lagen die Ratten mit renovasculärem Bluthochdruck an der Spitze aller Hochdruckkollektive. Bei den einzelnen Tieren fanden sich nahezu immer Blutdrucke zwischen 160 bis 190 mmHg.
In der Mittelwertskurve lag der Wert in der 30. Minute (= zu Versuchsbeginn) bei 185 mmHg, fiel dann bis zur 70. Minute fast linear auf 166 mmHg ab und stabilisierte sich dann bis zur 130. Minute zwischen 165 und 170 mmHg.

Die D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruckratten wiesen initial die höchsten Blutdruckwerte auf, wobei sich dann im Laufe der Versuche aber auch die ausgeprägtesten Schwankungen einstellten. So streuten die Blutdruckwerte bei einzelnen Tieren zwischen 160 bis 210 mmHg. Eine der Ratten erreichte nur einen durchschnittlichen Wert von 160 mmHg.

In der Abbildung beginnt die Kurve in der 30. Minute bei 197 mmHg, fällt dann nach einer Plateau-Bildung bei 50 bis 70 Minuten und 180 mmHg bis zur 100. Minute auf 160 mmHg ab und steigt schließlich bis zur 130. Minute mit Tendenz zur Stabilisierung auf Werte um 170 mmHg wieder an.

Bei den Spontan-Hochdruckratten schließlich zeigte sich das konstanteste Blutdruckverhalten unter allen getesteten Hochdruckgruppen. Die registrierten Werte der einzelnen Ratten lagen durchschnittlich zwischen 160 bis 175 mmHg. In der Abbildung bewegen sich die Mittelwerte von der 30. Minute bis zur 80. Minute zwischen 160 und 165 mmHg, in der 90. Minute kommt es zu einem Anstieg auf 168 mmHg und danach zu einem tendenziellen Abfall auf 158 mmHg in der 120. Minute.



Blutdruckhöhe und Blutdruckverhalten der Ratten während der Experimente (mmHg arterieller Mitteldruck bei blutiger Messung an der Arteria femoralis dextra; Inactin-Narkose, Pilocarpin-Stimulation). Werte ± SEM.

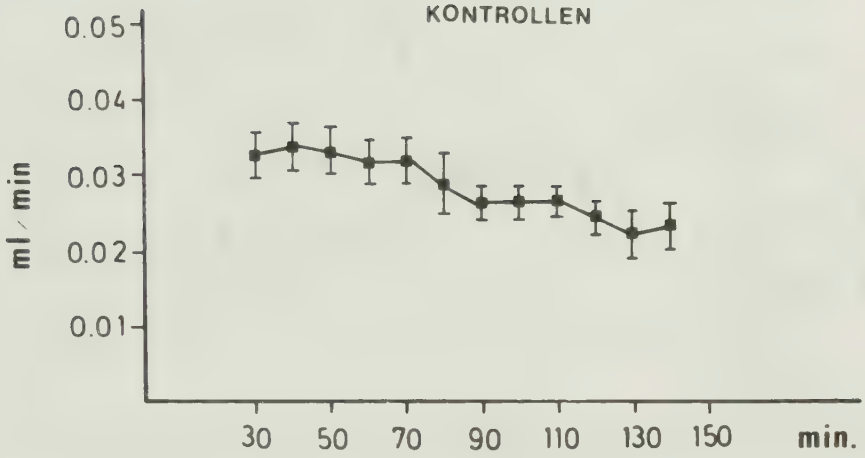
II. SPEICHELSEKRETIONSVOLUMEN VERSCHIEDENER HOCHDRUCKFORMEN BEI FRAKTIONIERTER PROBENSAMMLUNG

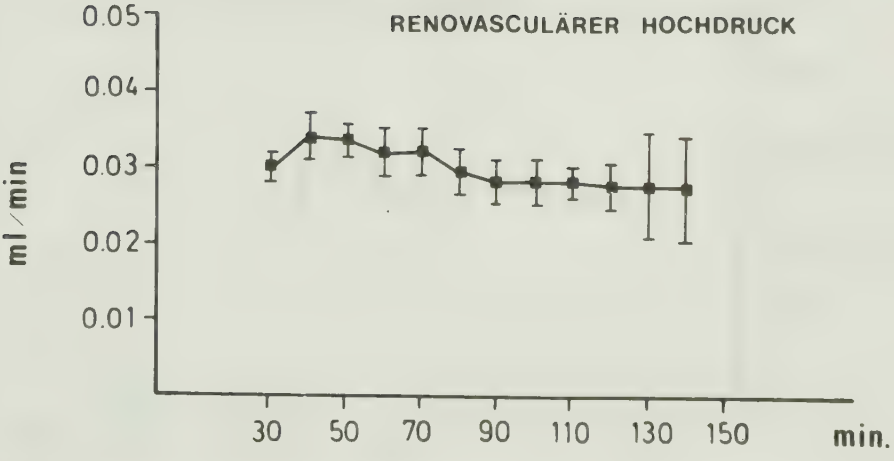
Die durchschnittlichen Flußraten lagen bei allen Tiergruppen zwischen 0,2 und 0,35 ml/10 min. Während in den Abbildungen die ersten fünf Werte bei Kontrolltieren, renovasculären Hochdrucktieren und D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdrucktieren durchweg über 0,3 ml/10 min. liegen, wird dieses Durchschnittsvolumen von den Spontan-Hochdruck-Ratten zu keinem Zeitpunkt der fraktionierten Probensammlung erreicht.

Die Ratten mit Spontan-Hochdruck lagen mit ihrem insgesamt sehr konstanten Speichel-output am niedrigsten (Durchschnittswerte 0,23 bis 0,28 ml/10 min.).

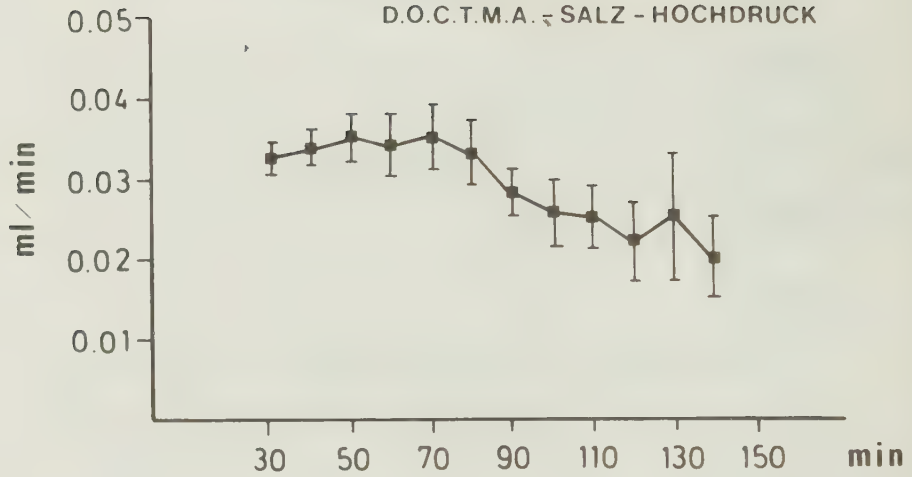
Das größte Speichelvolumen wurde von den Ratten mit renovasculärem und mit D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruck sezerniert, wobei durch die Abbildung deutlich gezeigt ist, daß bei ersteren sich die Sekretionsleistung der Drüsen im Vergleich zu den D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruckratten, die zwar die höchsten Einzelwerte erreichten, durchschnittlich dann aber bis 0,2 ml/10 min. abfielen, nur unwesentlich erschöpfte.

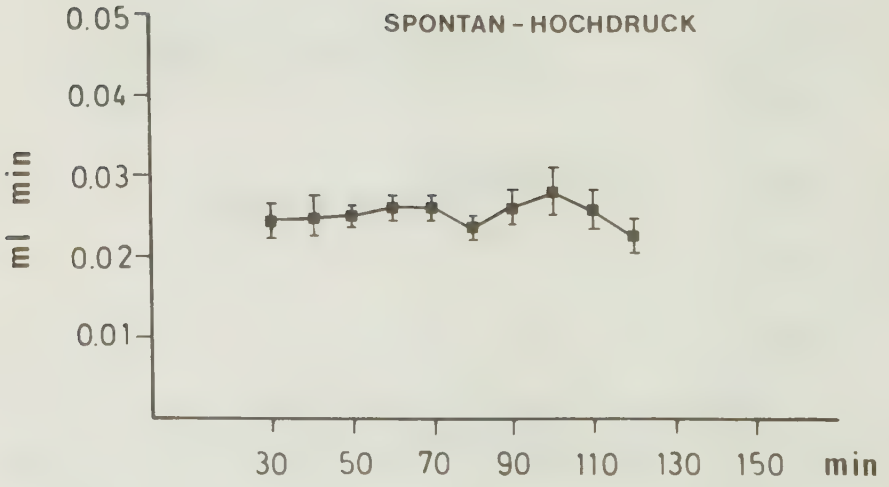
Bei den normotensiven Kontrolltieren lag das zu Beginn sezernierte Speichelvolumen deutlich über 0,3 ml/10 min. und fiel dann fast kontinuierlich auf 0,22 ml/10 min. am Ende der Versuche ab.





Parotisspeichelvolumen (ml/min.) aus beiden Drüsen bei fraktionierter Probensammlung (Zehnminutenfraktion, Inactin-Narkose, Pilocarpin-Stimulation). Werte ± SEM.





Parotisspeichelvolumen (ml/min.) aus beiden Drüsen bei fraktionierter Probensammlung (Zehnminutenfraktion, Inactin-Narkose, Pilocarpinstimulation). Werte ± SEM.

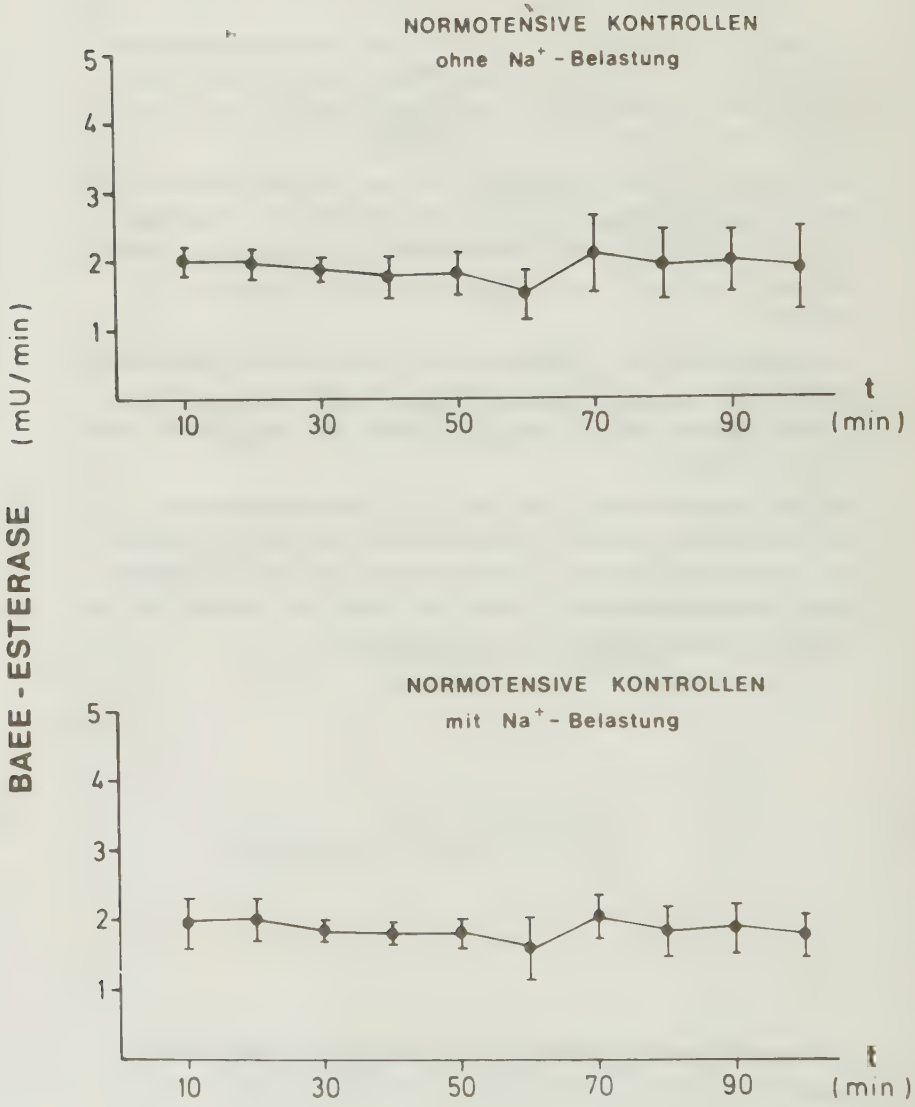
III. BAEE-ESTERASE AKTIVITÄT BEI NORMOTENSIVEN RATTEN NACH ORALER KOCHSALZBELASTUNG

Bei den 12 Experimenten mit normotensiven Spraque-Dawly Ratten mit und ohne orale NaCl-Belastung (7 Tiere mit, 5 Tiere ohne Kochsalzbelastung) waren die Tiere 13 bis 14 Wochen alt und 250 bis 300 g schwer.

Die Bestimmung des Serum-Natriums bei den NaCl-belasteten Tieren ergab durchschnittlich 130 mVal/l, bei den Kontrolltieren 135 mVal/l. Der durchschnittliche Wert des Serum-Kaliums lag für beide Kollektive gleichermaßen bei 3,75 mVal/l.

Die Ergebnisse der BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivitätsmessung ließen keine signifikanten Differenzen zwischen Kontrolltieren und Ratten mit 10wöchiger oraler NaCl-Belastung erkennen.

Von den Einzelwerten lagen bei den Kontrolltieren 94,2 % der gemessenen Proben im Bereich von 1,0 bis 6,0 mU/min; bei den NaCl-belasteten Tieren lagen 95,5 % in diesem Bereich. Die Mittelwerte liegen für beide Kollektive bei relativ geringer Dispersion um 2,0 mU/min.



BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivität (mU/min) im Parotis-speichel normotoner Ratten nach zehnwöchiger Natrium-Chlorid-Belastung und normotoner Kontrollratten. Werte MW ± SEM.

IV. BAEE-ESTERASE (KALLIKREIN) - AKTIVITÄT IM PAROTISSPEICHEL NORMOTONER UND HYPERTONER RATTEN

In der Gruppe der normotensiven Ratten wurden alle Kontrolltiere zu den verschiedenen Hochdruckformen zusammengefaßt. Dies war möglich, nachdem sich gezeigt hatte, daß die scheinoperierten männlichen Spraque-Dawly Ratten, die ursprünglich als spezielle Kontrolle zu den D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruckratten und zu den renovasculären Hochdruck-Ratten gelten sollten, sich hinsichtlich der Höhe der BAEE-esterase Aktivität im Parotisspeichel weder untereinander noch von den männlichen Wistar-Kontrollen der spontanhypertensiven Ratten unterschieden.

Bei den normotonen Ratten lag die BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivität zu Beginn der Versuche bei etwa 4 mU/min., fiel in den ersten 60 Minuten ab und stabilisierte sich ab der 70. Minute bei 2,0 bis 2,5 mU/min. In diesem Bereich hatte sich auch der überwiegende Teil der gemessenen Speichelproben bei den NaCl-belasteten Tieren und deren Kontrollen gefunden.

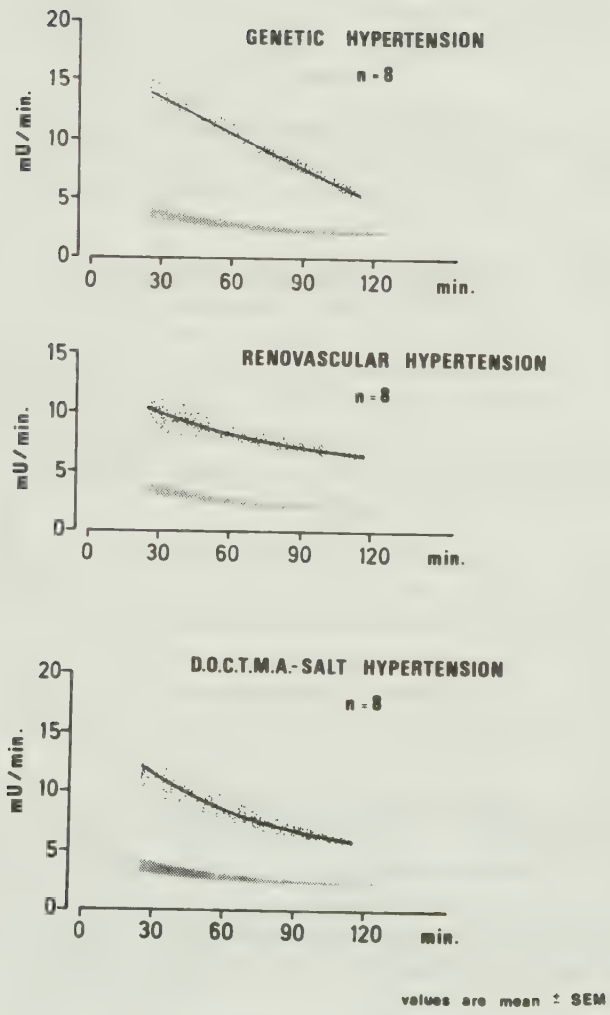
Bei allen Hochdruckkollektiven zeigte sich im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine Erhöhung der im Parotisspeichel nachweisbaren BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivität.

Dieser Anstieg war am höchsten bei den spontanhypertensiven Ratten, bei denen Enzymaktivitäten von durchschnittlich 13,8 mU/min. zu Versuchsbeginn gemessen wurden. Es folgte ein nahezu kontinuierlicher Abfall auf 5,2 mU/min. 120 Minuten nach Start der Experimente.

Bei den Ratten mit D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruck fanden sich zu Beginn der Experimente BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivitäten von etwa 13 mU/min., was einem Anstieg auf über 300 % gegenüber den Kontrollen gleichkommt. In der 120. Minute nach Start der Experimente waren hier noch Enzymaktivitäten von durchschnittlich 6,0 mU/min. nachweisbar.

Den gegenüber den Kontrolltieren geringsten BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivitätsanstieg unter den hypertensiven Gruppen zeigten die Tiere mit renovasculärem Hochdruck. Hier fanden sich in der 30. Minute Enzymaktivitäten von 10 mU/min., was im Vergleich zu normotensiven Ratten einer Erhöhung auf ca. 250 % gleichkommt. Bis zur 130. Minute kam es zu einem Abfall der Aktivität auf durchschnittlich 6,5 mU/min.

Damit bot das Kollektiv der renovasculären Hochdruckratten hinsichtlich der BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivitätserhöhung im Parotisspeichel das konstanteste Bild.



BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivität (mU/min.) im Parotisspeichel von pilocarpinstimulierten, normotensiven und hypertensiven (D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruck und RENOVASCULÄRER - Hochdruck) männlichen Spraque-Dawly-Ratten und von SPONTAN-HYPERTENSIVEN männlichen Wistar-Ratten. Werte MW ± SEM.

V. BAEE-ESTERASE (KALLIKREIN) - AKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER FLUSSRATE

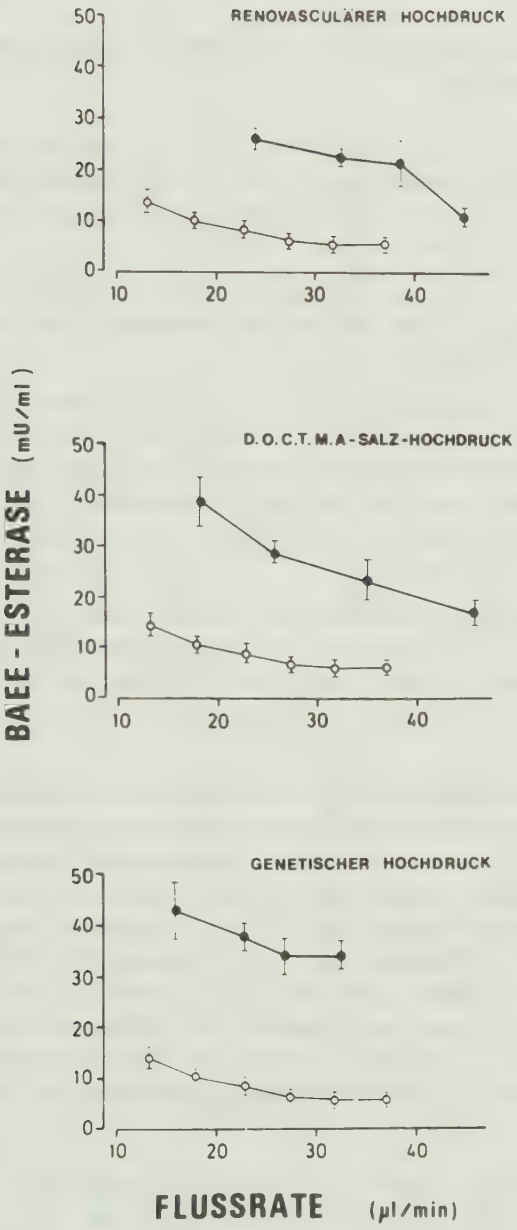
Es wurde, unabhängig von der Höhe der BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivität bei den unterschiedlichen Tiergruppen, ein Abfall der Volumenaktivität (mU/ml) bei zunehmender Flußrate festgestellt.

Bei den normotensiven Kontrollratten lag bei einer Flußrate von 15 µl/min. die BAEE-esterase (Kallikrein) - Volumenaktivität bei 14 mU/ml und fiel fast gleichmäßig bis auf 5 mU/ml bei einer Flußrate von 37 µl/ml ab.

In der Gruppe der renovasculären Hochdruckratten, bei denen das sezernierte Speichelvolumen insgesamt höher lag, fand sich die BAEE-esterase (Kallikrein) - Volumenaktivität bei 26 mU/ml entsprechend einem Speichelvolumen von 24 µl/min. Bis zu einer Flußrate von 38 µl/min. war der zu verzeichnende Aktivitätsabfall relativ gering, bei zunehmender Flußrate wurden dann bei 45 µl/min noch durchschnittliche Aktivitäten von 11 mU/ml gemessen.

Ein konstantes Bild bot sich in der Gruppe der Spontan-Hochdruckratten, die mit ihrer unter allen Vergleichsgruppen geringsten Flußrate die höchsten BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivitäten pro µl Speichel aufwiesen. Es kam bei einer Volumenaktivität von 43 mU/ml entsprechend einer Flußrate von 16 µl/min. zu einem Abfall auf etwa 34 bis 35 mU/ml bei einer Flußrate von 30 bis 35 µl/min.

Bei den D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdrucktieren war die stärkste negative Korrelation zwischen Flußrate und BAEE-esterase (Kallikrein) - Volumenaktivität zu verzeichnen. Bei 18 µl/min. lag die durchschnittliche Enzymaktivität bei fast 40 mU/ml und fiel dann auf durchschnittlich 17 mU/ml ab, wenn das sezernierte Speichelvolumen auf etwa 46 µl/min. anstieg.



BAEE-esterase - Volumenaktivität (mU/ml) im Parotisspeichel normotoner und hypertoner männlicher Ratten bei unterschiedlicher Flußrate (µl/min.), Inactin-Narkose, Pilocarpinstimulation. Werte MW ± SEM.

VI. BAEE-ESTERASE (KALLIKREIN) - AKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER BLUTDRUCKHÖHE

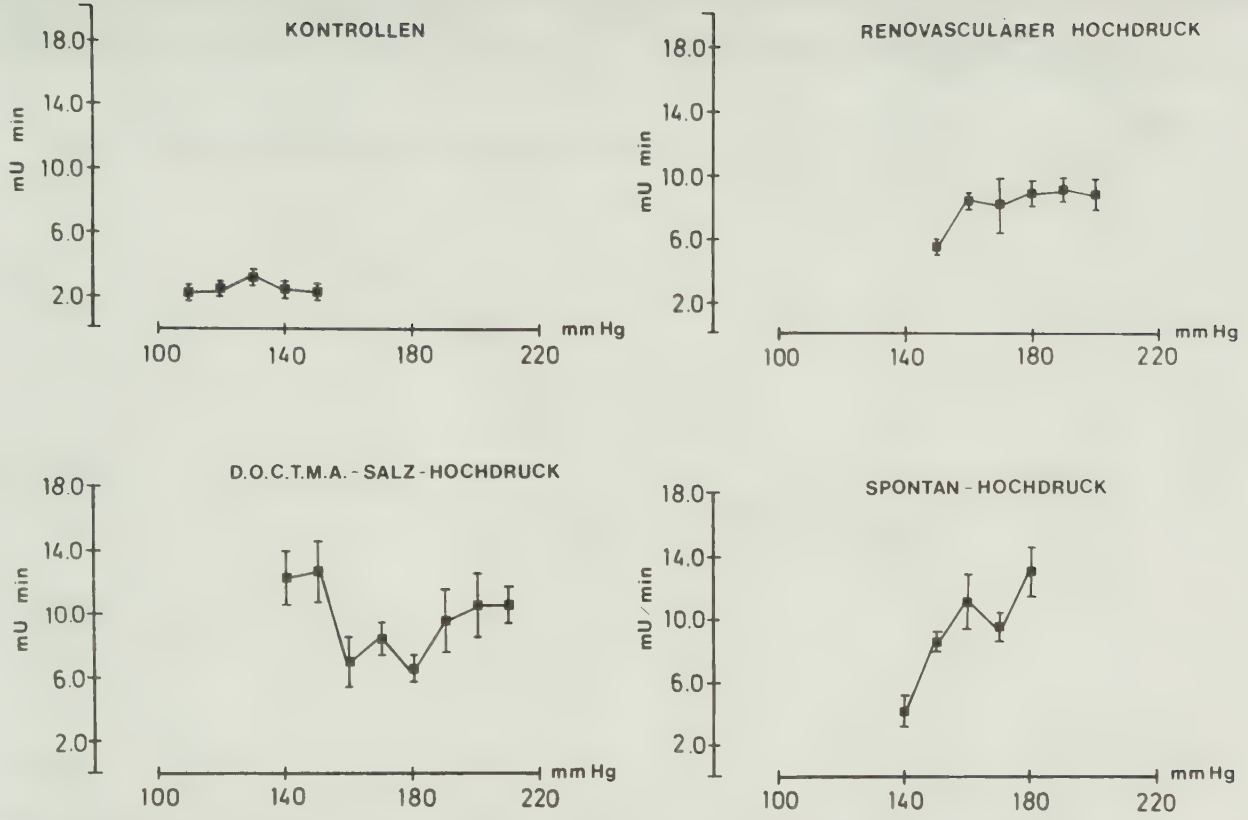
Die normotensiven Kontrollratten zeigten bei Blutdruckwerten zwischen 110 und 150 mmHg keinen Anstieg oder Abfall der BAEE-esterase - Aktivität, die durchschnittlich zwischen 2,0 bis 3,0 mU/min. lag.

Bei den Ratten mit renovasculärem Hochdruck kam es zwischen 140 und 200 mmHg zu einem Anstieg der Enzymaktivität von 5,4 mU/min. auf 9,0 mU/min.

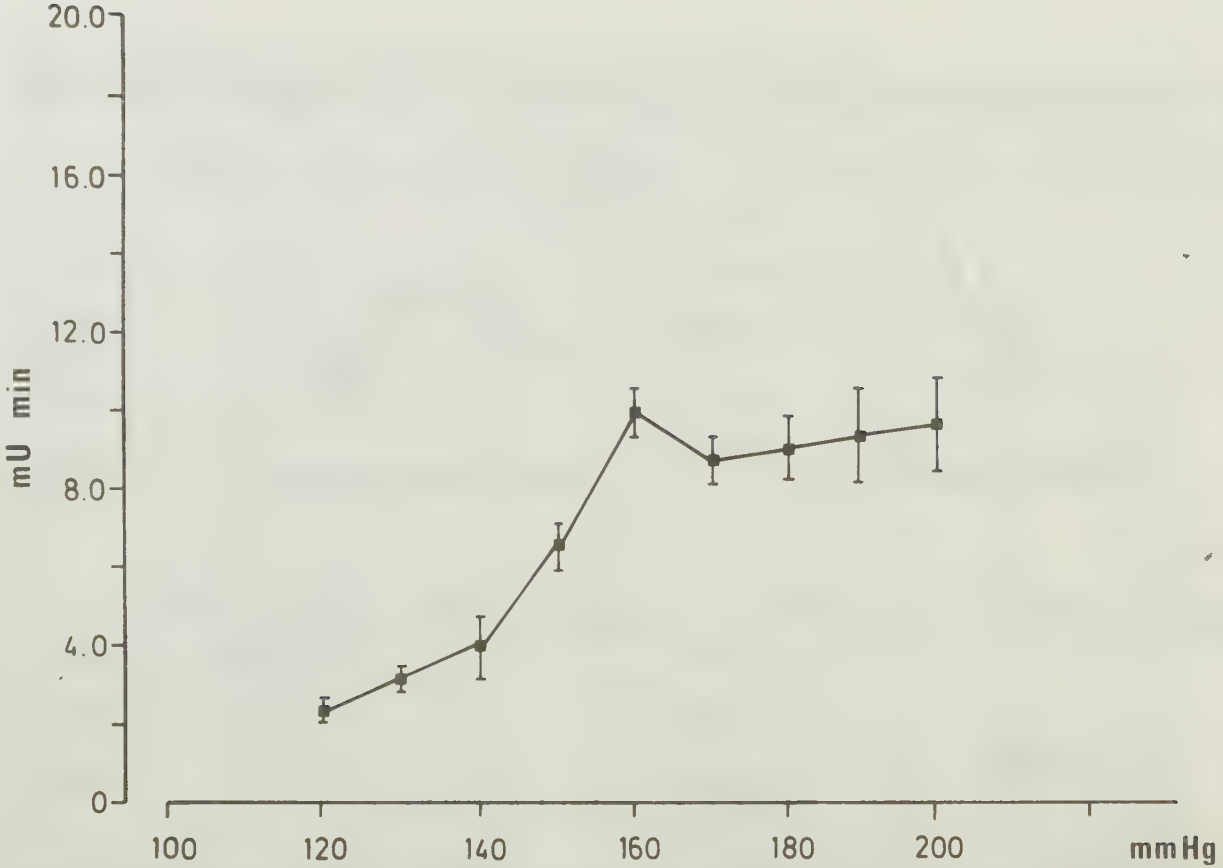
In der Gruppe der D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruckratten fiel ein Tier mit durchschnittlich 150 mmHg und 12 bis 13 mU/min. BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivität aus der Reihe. Ansonsten war auch hier ein Anstieg der Enzymaktivität von 7,0 mU/min. bei 160 mmHg auf 10,5 mU/min. bei 210 mmHg zu verzeichnen.

Bei den spontanhypertensiven Ratten war der BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivitätsanstieg mit zunehmendem Blutdruck am ausgeprägtesten. Es kam, ausgehend von etwa 4,0 mU/min. bei 140 mmHg, zu einer Aktivitätserhöhung auf 13 mU/min. bei 180 mmHg.

In der zuordnenden Zusammenfassung aller vier Tiergruppen (normotensive Kontrollratten, renovasculäre Hochdruckratten, D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruckratten, spontanhypertensive Ratten) zeigt sich die Zunahme der BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivität im Parotisspeichel deutlich. Es kommt - ausgehend von 2 mU/min. bei 120 mmHg - zu einem Anstieg auf 10 mU/min. bei 200 mmHg. Der ausfallende Wert von 9,8 mU/min. bei 160 mmHg ist auf die Gruppe der Spontan-Hochdruckratten zurückzuführen, da dieses Kollektiv mit seinen hohen Enzymaktivitäten konzentriert in die Mittelwertsberechnung bei 160 mmHg einging.



BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivität (mU/min) im Parotisspeichel in Korrelation zum Blutdruck (mmHg) bei narkotisierten, pilocarpinstimulierten Ratten mit verschiedenen Formen der Hypertonie. Werte der BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivität: MW ± SEM.



BAEE-esterase (Kallikrein) - Aktivität (mU/min.) im Parotisspeichel normotoner und hypertoner männlicher Spraque-Dawly- und Wistar-Ratten bei verschiedener Blutdruckhöhe (mmHg). Inactin-Narkose, Pilocarpin-Stimulation. Werte MW ± SEM.

VII. NATRIUM- UND KALIUM-KONZENTRATION IM PAROTISSPEICHEL NORMOTONER UND HYPERTONER RATTEN

Das Serum-Natrium lag bei den normotonen Kontrolltieren durchschnittlich bei 132 mVal/l, bei den Ratten mit renovasculärem Hochdruck bei 135 mVal/l, bei den Ratten mit D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruck ebenfalls bei 135 mVal/l und bei den Ratten mit Spontanhochdruck bei 120 mVal/l.

Das Serum-Kalium war bei den Kontrolltieren durchschnittlich 3,70 mVal/l, bei renovasculären Hochdruckratten 4,0 mVal/l, bei D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruckratten 2,57 mVal/l und bei den Spontanhochdruckratten durchschnittlich 3,0 mVal/l.

Natriumkonzentration:

Im Parotisspeichel der normotonen Kontrolltiere fand sich mit zunehmender Speichelkollektion zeitweise ein leichter Rückgang des anfangs bei 120 mVal/l liegenden Natriumspiegels auf 103 mVal/l in der 120. Minute. Bis zur 140. Minute kam es dann wieder zu einem Anstieg auf 110 mVal/l.

Insgesamt etwas niedriger als bei den Kontrolltieren waren die Speichel-Natrium-Konzentrationen bei den renovasculären Hochdruckratten. Hier fiel die Konzentration in den ersten 90 Minuten der Speichelkollektion von 111 mVal/l auf 95 mVal/l ab und lag dann bis zur 140. Minute bei durchschnittlich etwa 100 mVal/l.

Eine gegenüber den Kontrolltieren und auch gegenüber den renovasculären Hochdrucktieren deutlich erniedrigte Speichel-Natrium-Konzentration fand sich bei den Ratten mit D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruck. Von 95 mVal/l bei 40 Minuten fiel die Konzentration auf 72 mVal/l nach 140 Minuten ab.

Die Ratten mit Spontanhochdruck lagen mit ihrer Natrium-Konzentration im Parotisspeichel zwischen der Gruppe der renovasculären und der Gruppe der D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdrucke. In den ersten 100 Minuten der Probensammlung lagen die Konzentrationen mit geringer Abweichung bei 96 mVal/l. Am Ende der Speichelkollektion kam es dann zu einem leichten Anstieg auf 103 mVal/l.

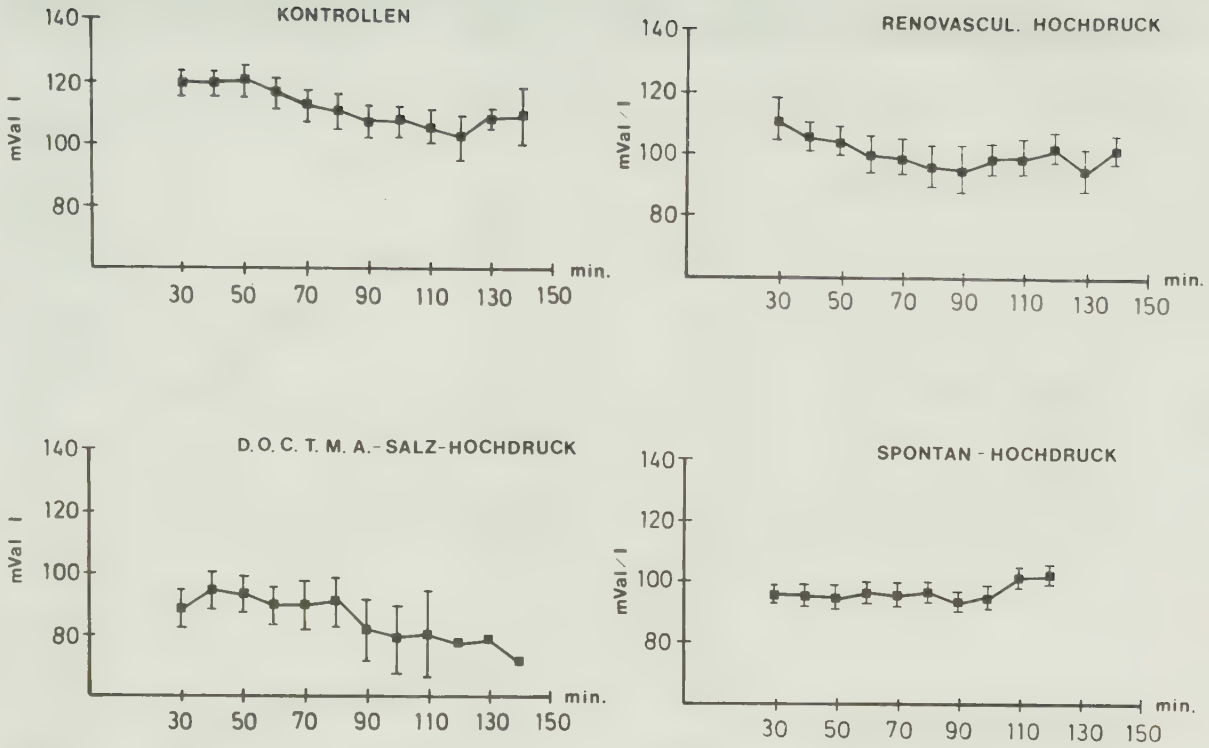
Kaliumkonzentration:

Der Kaliumgehalt des Parotisspeichels verhielt sich bei quantitativer Unterschiedlichkeit qualitativ tendenziell bei Kontrolltieren, renovasculären- und Spontanhochdrucktieren gleich. Bei allen drei Gruppen kam es nach einem Abfall in den ersten drei Proben zu einer verhältnismäßigen Stabilisierung auf einem neuen Niveau. So fielen die Kontrolltiere von 10,5 mVal/l auf 8,2 ± 0,5 mVal/l ab.

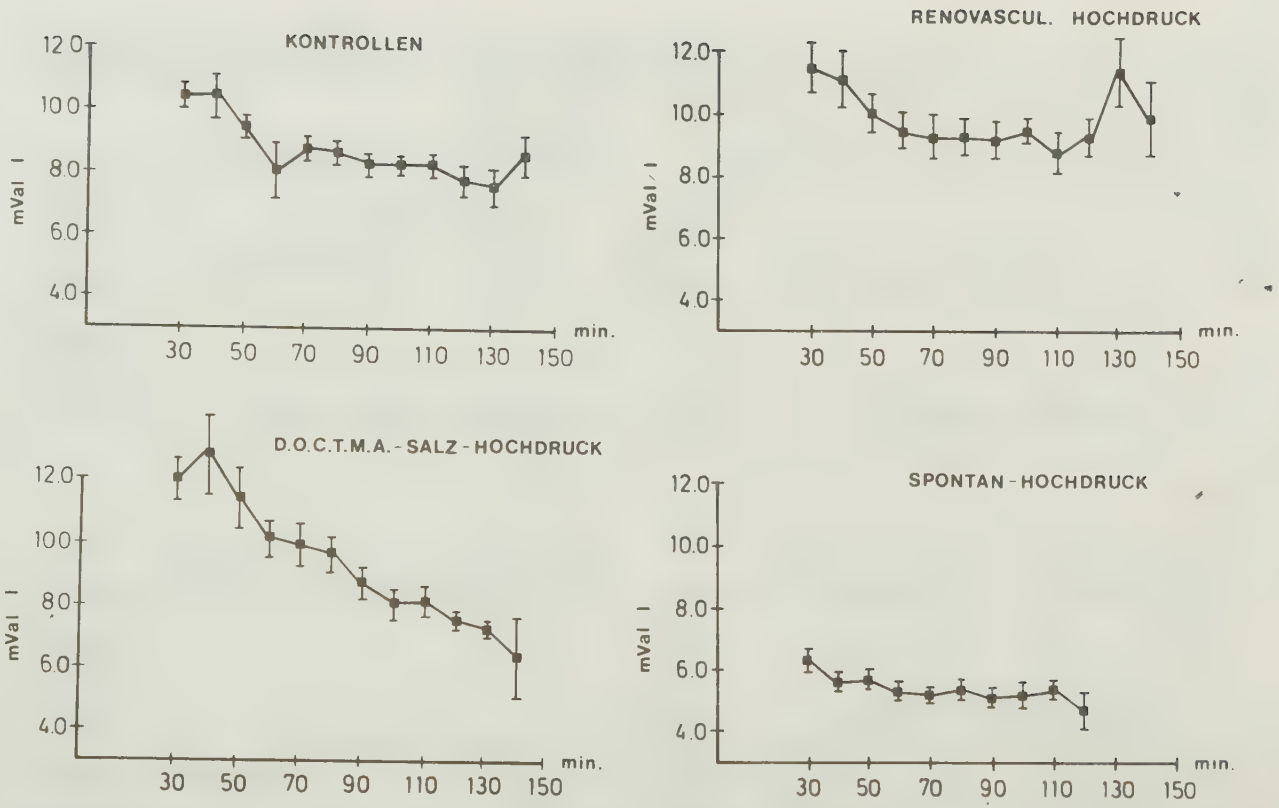
Die Ratten mit renovasculärem Hochdruck gingen von 11,5 mVal/l auf 9,0 bis 9,5 mVal/l zurück, und bei den Spontan-Hochdruckratten, deren Kaliumspiegel im Speichel deutlich niedriger lag als der der beiden anderen Gruppen, fielen von 6,3 mVal/l auf 5,4 ± 0,3 mVal/l ab. Die letzte Probe nach 120 Minuten hatte nur noch eine Kalium-Konzentration von 4,7 mVal/l.

Bei dem Kollektiv der D.O.C.T.M.A.-SALZ-Hochdruckratten fand sich ein qualitativ völlig anderes Verhalten des Kaliumspiegels während der fraktionierten Probensammlung als bei den vorher erwähnten Gruppen.

Hier kam es bei sehr hohen Anfangswerten von über 12 mVal/l zu einem permanenten, steilen Abfall auf 6,4 mVal/l in der 140. Minute. Eine Tendenz zur Stabilisierung oder eine Plateaubildung in der Kurve zeigte sich nicht.



Natrium-Konzentration (mVal/l) im fraktioniert gesammelten Parotisspeichel normotoner Ratten und Ratten mit renovasculärem -, D.O.C.T.M.A.-SALZ - und spontanem Hochdruck. Inactin-Narkose, Pilocarpin-Stimulation, Werte MW ± SEM.



Kalium-Konzentration (mVal/l) im fraktioniert gesammelten Parotisspeichel normotoner Ratten und Ratten mit renovasculärem -, D.O.C.T.M.A.-SALZ - und spontanem Hochdruck. Inactin-Narkose, Pilocarpin-Stimulation. Werte MW ± SEM.

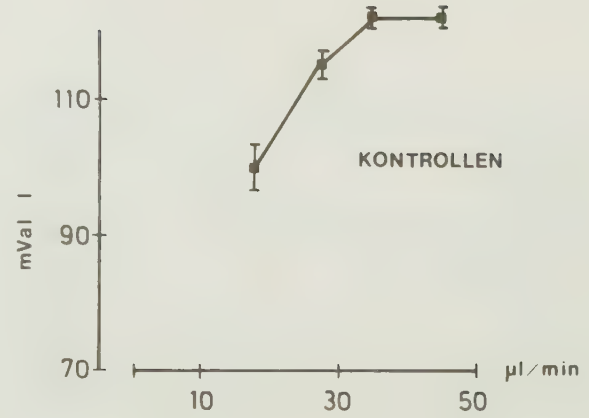
VIII. NATRIUM- UND KALIUM-KONZENTRATION IM PAROTISSPEICHEL IN KORRELATION ZUR FLUSSRATE

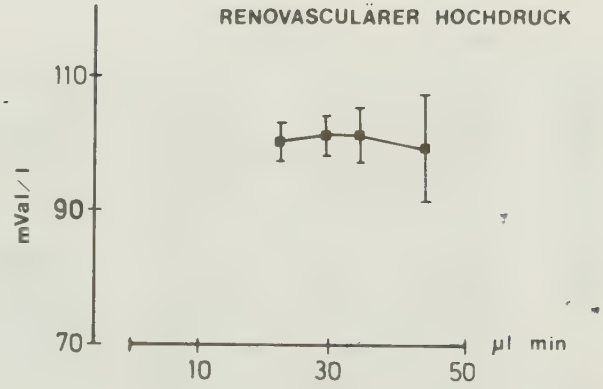
Wie aufgrund der Ergebnisse der Natrium/Kalium-Bestimmungen im Parotisspeichel und der Bestimmung der Speichelexkretionsvolumina während der fraktionierten Probensammlung zu erwarten war, ließen sich auch gruppenspezifische Korrelationen bei der Untersuchung der Speichel-Na - und Speichel-K-Konzentrationen bei unterschiedlicher Flußrate aufstellen.

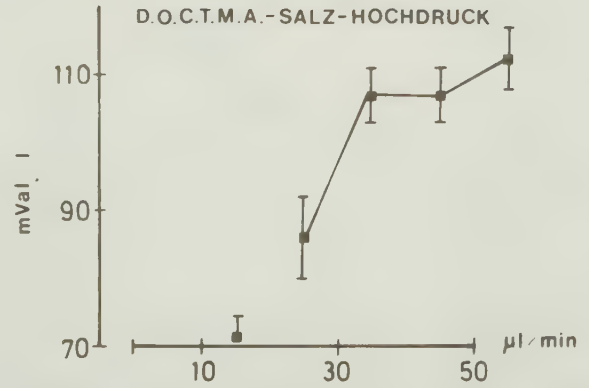
Bei den normotonen Kontrolltieren wie auch bei den D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdrucktieren ließ sich in den Proben mit höherem Speichelexkretionsvolumen auch eine höhere Kalium-Konzentration und eine wesentlich höhere Natrium-Konzentration nachweisen.

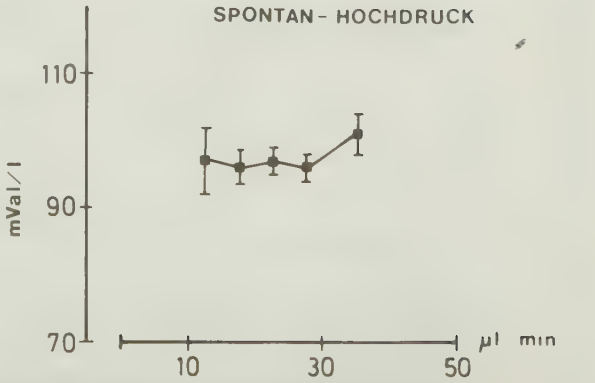
Bei den renovasculären Hochdruckratten änderte sich die Natrium-Konzentration nicht signifikant, die Kalium-Konzentration war bei zunehmender Flußrate eher rückläufig.

In der Gruppe der Ratten mit Spontanhochdruck zeigte sich beim Speichel-Natrium nach konstanten Konzentrationen zwischen 10 bis 30 µl/min ein Konzentrationsanstieg um 5 % bei Proben mit über 30 µl/min. Die Speichel-Kalium-Konzentration der Spontanhochdruckratten lag bei Flußraten von 10 bis 35 µl/min. unverändert bei 5,5 $\pm$ 0,2 mVal/l.

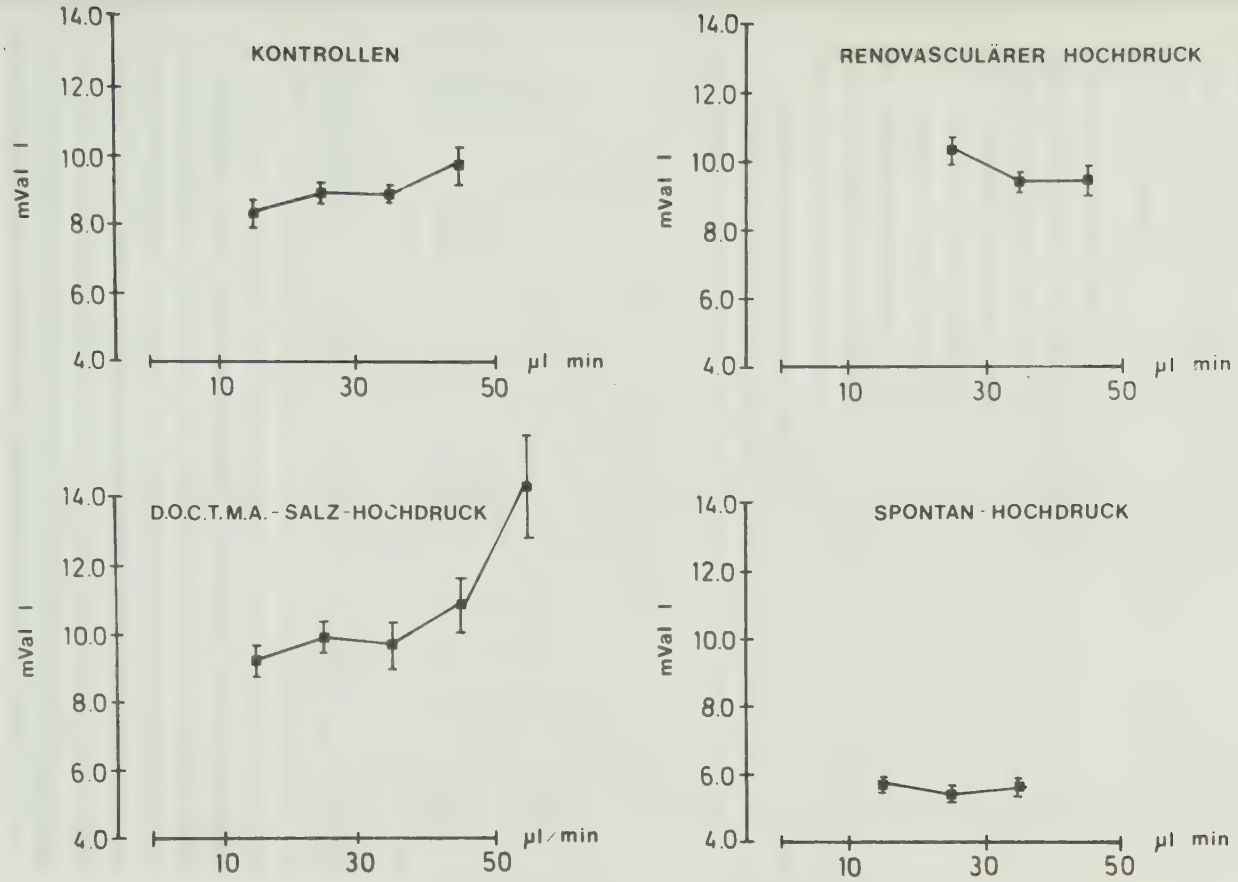








Natrium-Konzentration (mVal/l) in Relation zum Speichelexkretionsvolumen (µl/min.) bei fraktionierter Probensammlung an pilocarpinstimulierten Ratten. Werte: MW ± SEM.



Kalium-Konzentration (mVal/l) in Relation zum Speichelexkretionsvolumen (µl/min.) bei fraktionierter Probensammlung an pilocarpinstimulierten Ratten. Werte: NW ± SEM.

DISKUSSION

I. KALLIKREIN BEI HYPERTONIE

Erste fundierte Veröffentlichungen über Kallikreinexkretion bei Patienten mit arterieller Hypertonie erschienen vor nunmehr fast 50 Jahren (ELLIOT und NUZUM 1934, WERLE 1938), als nachgewiesen wurde, daß Patienten mit erhöhtem Blutdruck verminderte Urin-Kallikrein-Ausscheidung aufweisen.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen des Kallikrein-Kinin-Systems beim Bluthochdruck wurden vorwiegend an Nierengewebe und Urin durchgeführt. Dabei wurden verminderte Urin-Kallikreinausscheidungen bei essentieller Hypertonie des Menschen und bei verschiedenen experimentellen Hochdruckformen der Ratte (außer bei D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruck, wo die Urinkallikrein-Exkretion erhöht war) festgestellt.

Die Aussagekraft des Kallikreingehaltes im Urin dürfte jedoch limitiert sein durch die Abhängigkeit der Urin-Kallikreinausscheidung von der effektiven Nierenleistung, die gerade bei verschiedenen Formen der Hypertonie durch vasculäre oder entzündliche Prozesse vermindert sein kann. Auch ist eine Abhängigkeit der Urin-Kallikrein-Exkretion von der Nahrung (Elektrolyte, Eiweiß) nachgewiesen (MARGOLIUS 1974, HORWITZ 1975, WERLE 1960, VOGEL 1962, WERLE 1958).

Speichelkallikrein dagegen bleibt durch Nahrungsmodifikationen unbeeinflußt (FREY 1968). Zudem ist die Lokalisation des Speichelkallikrein im Cytoplasma der granulierten Tubuli und an der luminalen Zellseite der Streifenstücke bekannt (ØRSTAVIK 1975, BRANDTZAEG 1976). Das Enzym liegt im Speichel in ausschließlich aktiver Form vor (FREY 1968), und Speicheldrüsen stehen hinsichtlich ihres Kallikreingehaltes unter allen untersuchten Geweben mit an der Spitze (FREY 1968).

Wenn auch nicht bewiesen ist, daß alle im Speichel gemessene BAEE-esterase - Aktivität dem Kallikrein zuzuschreiben ist, so

kann doch aufgrund verschiedener Untersuchungen angenommen werden, daß dem Kallikrein der Hauptanteil der esterolytischen Aktivität des Speichels zukommt (BHOOLA 1969, WOTMAN 1969, AMUNDSEN et al.).

Bei den durchgeführten Untersuchungen lagen die im Rattenparotisspeichel gemessenen BAEE-esterase - Aktivitäten bei normotonen Tieren im Bereich von 2 - 4 mU/min. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen über Kallikreinausscheidung im Parotisspeichel bei normotonen Patienten (EICHNER 1976). Keine Unterschiede in der Höhe der Kallikreinexkretion im Parotisspeichel ließen sich bei weiteren Untersuchungen zwischen Spraque-Dawly- und Wistar-Kyoto-Ratten als spezielle Kontrolltiere zu spontanhypertensiven Okomoto-Ratten feststellen. Keine Unterschiede auch zwischen den einzelnen speziellen Kontrollgruppen, die scheinoperiert worden waren,und zwischen den Kollektiven, die einer 10-wöchigen oralen Kochsalz-Belastung ausgesetzt worden waren. Letzteres steht in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen, wo im Speichel auch keine Kallikreinveränderungen durch diätetische Elektrolyt-Manipulationen nachweisbar waren (FREY 1968). Im Gegensatz dazu sind Veränderungen der Urin-Kallikrein-Exkretion unter Kochsalzbelastung (CARRETERO 1977) und wohl auch bei Spraque-Dawly-Ratten im Vergleich zu Wistar-Ratten beschrieben (ARROGONI-MARTELLI 1975).

Aufgrund der im Parotisspeichel gefundenen Ergebnisse war es möglich, die untersuchten normotensiven Gruppen zu e i n e m Kontroll-Kollektiv zusammenzufassen.

Bei allen getesteten Hochdruckmodellen wurde eine signifikante Erhöhung der im Parotisspeichel gemessenen BAEE-esterase - Aktivität um das zwei- bis vierfache gegenüber den Kontrollratten festgestellt. Dabei ergaben sich signifikante Unterschiede auch zwischen den verschiedenen Hochdruckformen.
Die flußratenbezogene BAEE-esterase Exkretion war bei niedrigen Flußraten (20 µl/min) um den Faktor 2,5 erhöht bei renovasculären Hochdrucktieren, um den Faktor 3 bei D.O.C.T.M.A.-

SALZ-Hochdruck und um den Faktor 4 bei spontanhypertensiven Ratten. Dabei zeigte die BAEE-esterase - Aktivität ein umgekehrtes Verhältnis zu den Speichelflußraten mit höchsten Konzentrationen bei niedrigen Speichelsekretions-Volumina.

Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zur Urin-Kallikreinausscheidung bei Ratten mit Spontanhochdruck (GELLER 1975, PROCELLI 1975, CARRETERO 1975) und renovasculärem Hochdruck (CROXATTO 1970, JENNER 1973, CARRETERO 1973, MARGOLIUS 1972a) und in Übereinstimmung mit der Urin-Kallikrein-Ausscheidung bei Kortisonhochdruck (MARGOLIUS 1972a und 1972b).

Während sich bei den normotonen Kontrolltieren eine blutdruckabhängige Veränderung der BAEE-esterase - Aktivität zwischen Blutdruckwerten von 110 bis 150 mmHg nicht nachweisen ließ, konnte ein signifikantes Ansteigen der Kallikrein-Aktivität bei den hypertonen Gruppen mit zunehmender Blutdruckhöhe verzeichnet werden. Dabei lagen bei dem Bezugs- und Grenz-Blutdruckwert = 150 mmHg die BAEE-esterase - Aktivitäten bei den D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdrucktieren um das 3,5-fache, bei den renovasculären Hochdrucken um das 4-fache und bei den spontanhypertensiven Ratten um das 5-fache höher als bei den Kontrolltieren. In einer alle vier Tiergruppen zusammenfassenden Analyse zeigte sich ein Anstieg der Kallikrein-Aktivität von 2,3 mU/min. bei 120 mmHg arteriellem Mitteldruck auf durchschnittlich 9,7 mU/min. bei 200 mmHg. Das entspricht einem Anstieg auf über 400 %. Ähnlich beständige, negative Korrelationen zwischen Blutdruck und - allerdings erniedrigter - Urin-Kallikreinausscheidung wurden bei Menschen mit Bluthochdruck festgestellt (ZINNER 1976, 1977).

Die Ergebnisse der Kallikreinuntersuchungen im Parotisspeichel zeigen, daß das Speicheldrüsen-Kallikrein kaum als pathogenetischer Faktor der Hypertonie gelten kann und daß auch mit dem Renin-Angiotensin-System wegen des gleichartigen Verhaltens bei renovasculärem Hochdruck ("high renin hypertension") und bei D.O.C.T.M.A.-SALZ - und Spontan-Hochdruck ("low renin hypertension") keine gleichgerichtete Wirkungsverwandtschaft besteht. Es wäre daher diskutabel, ob die Blut-

druckerhöhung selbst für eine vermehrte Kallikrein-Ausscheidung im Parotisspeichel verantwortlich ist im Sinne eines durch erhöhten Blutdruck induzierten Gegenregulationsmechanismus. Daß der Blutdruck allein jedoch nicht der einzige Grund der erhöhten Kallikreinausscheidung sein kann, ist aus der unterschiedlichen blutdruckabhängigen Höhe der Kallikrein-Ausscheidung (bei Tier und Mensch) bei verschiedenen Hochdruckformen zu schließen.

II. ELEKTROLYTE UND KALLIKREIN BEI HYPERTONIE

Die Elektrolytbestimmungen im Serum ergaben eine Erniedrigung des Serum-Natriums bei spontanhypertensiven Ratten, während bei renovasculären - und D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruckratten eher eine (wenn auch nicht signifikante) Erhöhung zu finden war. Das Serum-Kalium war bei Spontanhochdruck und D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruck erniedrigt, bei renovasculärem Hochdruck leicht erhöht.

Die Elektrolytbestimmungen im Speichel zeigten eine Erniedrigung der Natriumkonzentration bei allen Hochdruckgruppen, am ausgeprägtesten beim D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruck. Die Kalium-Konzentrationen waren beim renovasculären Hochdruck erhöht, bei Spontanhochdruck deutlich erniedrigt, und beim D.O.C.T.M.A.-SALZ - Hochdruck fand sich nach anfangs ausgeprägter Erhöhung ein starker Abfall. Im Gegensatz zur BAEE-esterase - Aktivität war die flußratenabhängige Natrium-Konzentration des Parotisspeichels bei allen hypertensiven Gruppen signifikant erniedrigt, während das Kalium zu höheren Konzentrationen tendierte mit Ausnahme der Spontan-Hochdruckgruppe, wo sich ein deutlich erniedrigter Speichel-Kaliumgehalt fand.

Aufgrund dieses umgekehrten Verhaltens von Kallikreinaktivität und Speichel-Natrium im Parotisspeichel, aufgrund bekannter physiologischer Wirkungen des Kallikreins am Nephron (Natriurese), aufgrund der biologischen Lokalisation des Kallikreins in Speicheldrüsen an Orten intensivsten Elektrolyt-Transportes und aufgrund der nachgewiesenen gegensätzlichen Konzentratio-

nen von Kallikrein und Natrium in verschiedenen Speicheldrüsen (hohe Kallikreinaktivität in Gl. submandibularis und sublingualis mit niedrigen Natrium-Konzentrationen und nicht nachweisbare Kallikreinaktivität in Tränendrüsen mit Serum-ähnlichen Natrium-Konzentrationen) wäre es möglich, daß eine enge Verbindung zwischen Natrium-Ausscheidung und Kallikrein-Konzentration besteht.

Es wäre denkbar, daß es aufgrund erhöhter Kallikreinfreisetzung bei Hypertonie infolge veränderter Permeabilität der Zellmembran zu verstärkter Natrium-Reabsorption kommt, andererseits wäre möglich, daß eine erhöhte Natriumreabsorption im Gangsystem über vermehrte intrazelluläre Kaliumfreisetzung und cAMP-Mobilisierung zu einer vermehrten Kallikreinsekretion in die Speichelflüssigkeit führt.

Für die letztere Annahme könnten auch die für die Urin-Kallikreinsekretion gültigen Feststellungen sprechen, daß verminderte Natriumzufuhr und die Verabreichung Natrium-retinierender Steroide zu einer Erhöhung der Kallikrein-Exkretion führen und daß sich bei primärem Aldosteronismus und bei Bartter's Syndrom regelmäßig vermehrte Kallikrein-Exkretionen im Urin nachweisen lassen.

III. SCHLUSSFOLGERUNG

Die von uns festgestellten Veränderungen (erhöhte Speichelkallikrein-Ausscheidung bei Hypertonie) könnten Ausdruck eines Gegenregulationsmechanismus sein. Wenn, dieser Hypothese folgend, der erhöhte Blutdruck eine vermehrte Kallikreinbildung oder -freisetzung bewirkt, dann ist die Blutdruckerhöhung aber nicht als alleinige Ursache einer solchen anzusehen, da bei den verschiedenen Hochdruckformen deutliche Unterschiede der Kallikreinaktivität bei vergleichbaren Blutdruckwerten festgestellt wurden.

Ob ferner erhöhte Natrium-Reabsorption im Gangsystem der Parotis bei Hypertonie die Kallikreinexkretion steigert oder

als deren Folge auftritt, muß unbeantwortet bleiben. Zwar ist für die Urin-Kallikreinausscheidung eine Abhängigkeit von der Elektrolytzufuhr und Abhängigkeit vom wirksamen Blutspiegel an Natrium-retinierenden Steroiden bekannt, die Erhöhung des Mineralkortikoidspiegels bewirkt erhöhte Kallikreinexkretion im Urin, Spironolacton als Aldosteron-Antagonist vermindert die Urin-Kallikreinausscheidung, jedoch sind diese intrarenalen Regulationsmechanismen - wenn überhaupt - dann nur bedingt auf Mundspeicheldrüsen übertragbar. Wenn nun trotzdem Speicheldrüsen Zielorgane für Mineralkortikoide wären, dann könnte man zwar die vermehrte Speichel-Kallikreinexkretion bei D.O.C.T.M.A.-SALZ- und bei renovasculärem Hochdruck erklären, nicht aber bei spontanhypertensiven Ratten und bei der essentiellen Hypertonie des Menschen.

Möglich ist auch, daß es durch die bei Hypertonie bekannte Plasmakatecholamin-Erhöhung über eine α-Rezeptorenstimulation zu einer vermehrten Kallikreinfreisetzung in der Ohrspeicheldrüse kommt.

Weitere Steuermechanismen (physiologische und pathologische) dürften die Kallikrein-Exkretion im Parotisspeichel beeinflussen.

Die Mehrzahl der Untersuchungen scheint im Sinne eines kompensatorischen Zusammenhanges (z.B. eines Gegenregulationsmechanismus) zwischen Kallikrein-Kinin-System und Hypertonie interpretierbar.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei vergleichenden Untersuchungen wurde die Kallikrein-Aktivität bei verschiedenen Formen der Hypertonie und bei Normotonie gemessen.

Kallikrein setzt aus Kininogen Kinine frei, deren physiologische und pharmakologische Bedeutung außer in einer Steigerung der renalen Durchblutung, einer diuretischen und natriuretischen Wirkung auch in ihrem direkten Einfluß auf das periphere Gefäß-System im Sinne einer Arteriolendilatation und einer Venolenkonstriktion liegt.

Da Kallikreinbestimmungen bisher überwiegend im Urin (Urinkallikrein) durchgeführt worden waren, wurden die Untersuchungen jetzt aus Gründen der einfacheren Vergleichbarkeit in dem als Kallikrein-reich bekannten Parotisspeichel (Speicheldrüsenkallikrein) durchgeführt.

Während im Urin eine Erniedrigung der Kallikrein-Aktivität bei renovasculärer und spontaner Hypertonie und eine Erhöhung bei endokrinem Hochdruck festgestellt worden war, wurde eine erhöhte Kallikrein-Aktivität im Parotisspeichel bei Spontan-, renovasculärem - und Kortison-Salz-Hochdruck gefunden. Dabei zeigte sich bei renovasculärem Hochdruck eine Erhöhung auf ca. 250 %, beim Kortison-Salz-Hochdruck auf ca. 300 % und beim Spontan-Hochdruck auf über 300 %. Zudem konnte eine umgekehrte Korrelation zwischen Kallikrein-Aktivität und Flußrate festgestellt werden; Abhängigkeit zwischen Blutdruckhöhe und Kallikrein-Aktivität ließ sich nur bei hypertonen Ratten nachweisen.

Entsprechende Elektrolyt-Untersuchungen zeigten im Parotisspeichel eine mäßig bis deutlich verminderte Natrium-Konzentration bei renovasculärem Hochdruck und Spontan-Hochdruck; stark verminderte Speichelnatrium-Konzentrationen wurden beim Kortison-Hochdruck gefunden. Die Kalium-Konzentration im Parotisspeichel war bei renovasculärer Hypertonie leicht erhöht, beim Spontan-Hochdruck deutlich erniedrigt im Vergleich

zu normotonen Kontrollen. Bei den Kortison-Salz-Hochdruckratten stellte sich nach anfänglicher Erhöhung gegen Versuchsende eine Erniedrigung der Kalium-Konzentration ein.

Die vorliegenden Ergebnisse der Kallikreinaktivitätsmessung im Parotisspeichel lassen vermuten, daß das Kallikrein-Kinin per se nicht der induzierende pathogenetische Faktor der Hypertonie ist, sondern daß das Speichelkallikrein vielmehr als Folge einer Hypertonie im Sinne eines Gegenregulationsmechanismus erhöht gefunden wird.

In welcher Abhängigkeit Kallikreinexkretion und Elektrolyt-Haushalt in der Ohrspeicheldrüse bei Hypertonie stehen, kann derzeit jedoch noch nicht gültig beantwortet werden.

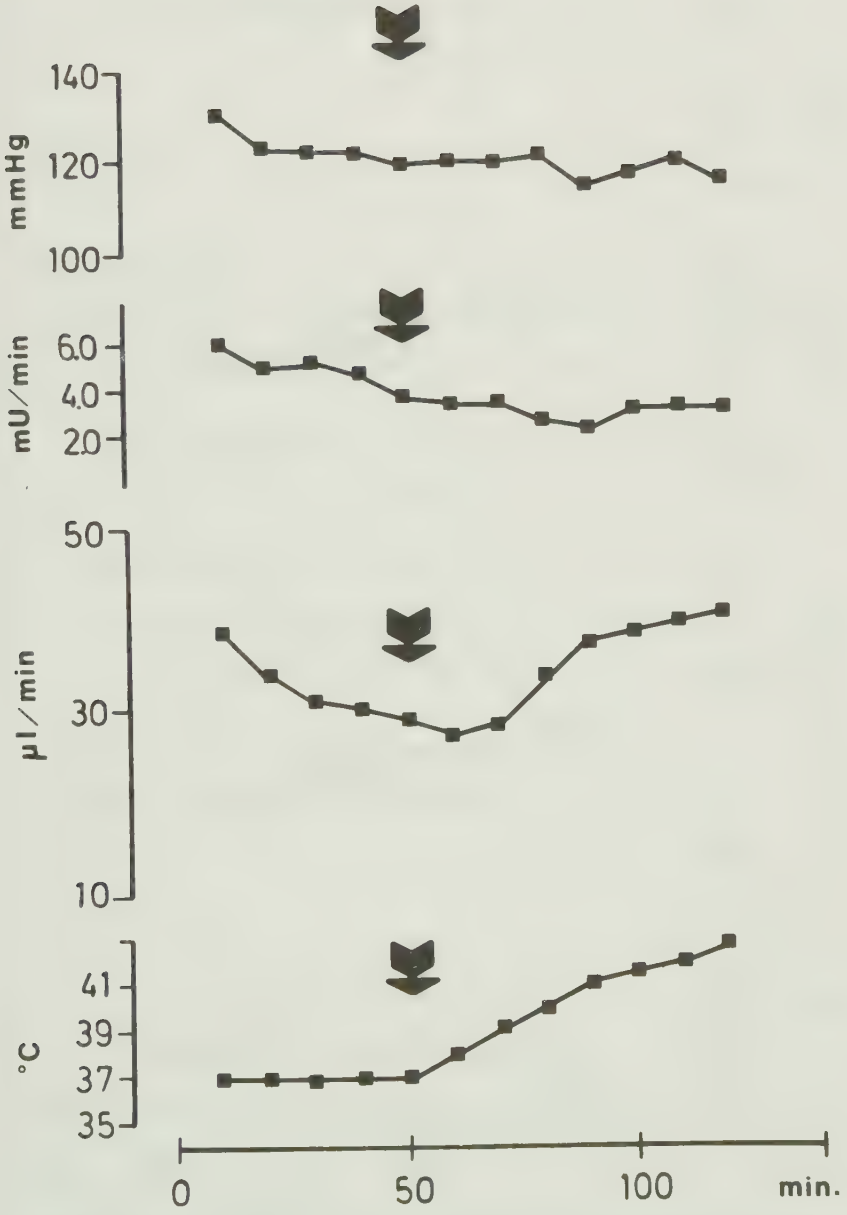
ANHANG ZUR METHODIK

Zeitweise auftretende Unregelmäßigkeiten bei der Durchführung der Tierexperimente in den Vorversuchen gaben Anlaß zur Überprüfung und Standardisierung der unmittelbaren Umgebungstemperatur der narkotisierten Ratten während der Dauer der Speichelkollektion.

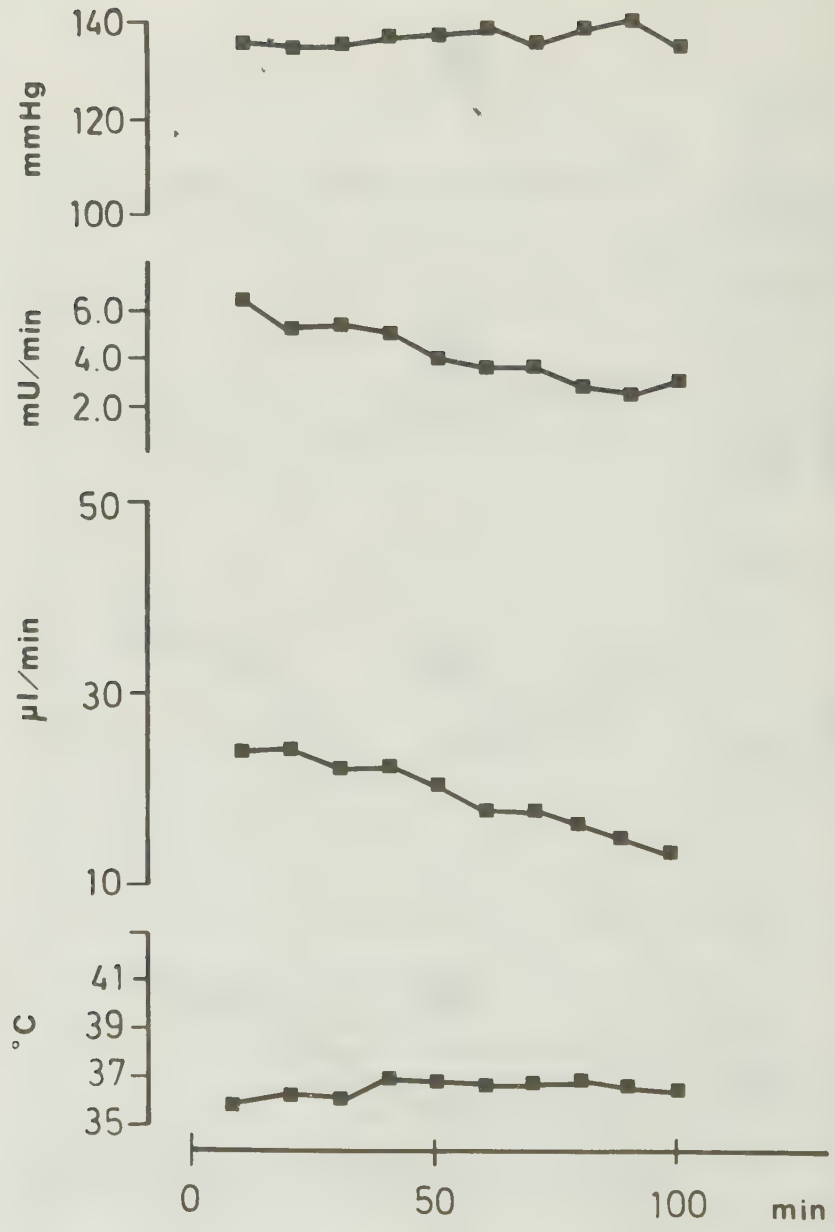
Es wurde das Verhalten von Blutdruck, Kallikrein-Exkretion und Speichelvolumen/Zeit in Abhängigkeit von der Körperaußentemperatur des Tieres untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß eine direkte Abhängigkeit des Speichelsekretionsvolumens der Parotis pro Zeiteinheit von der an der Bauchhaut des Tieres gemessenen Temperatur bestand. Bei Abkühlung der Körperaußentemperatur auf ca. 33° C kam der Speichelfluß fast zum Erliegen. Dagegen ließ sich durch Temperatursteigerung auf 40° C und mehr eine deutliche Zunahme des sezernierten Speichelvolumens erreichen.

Blutdruck und Kallikreinaktivität (mU/min) scheinen sich im Temperaturbereich zwischen $33 - 40^{\circ}$ C indifferent zu verhalten, sofern die Enzymaktivität nicht als Volumenaktivität (mU/ml) berechnet wird. Der durch die Außentemperatur und das angestiegene Speichelvolumen unbeeinflußte Verlauf der Kallikreinkurve erklärt sich aus der nachgewiesenen negativen Korrelation von Kallikrein-Aktivität und Flußrate.

Es scheint aufgrund der Untersuchungen empfehlenswert, den OP-Tisch vor Versuchsbeginn auf etwa 37° C vorzuwärmen und während des Experimentes die Körperaußentemperatur bei $36 - 37^{\circ}$ C zu halten. Das unter diesen Konditionen registrierte Verhalten von Blutdruck, Speichelsekretion, Kallikrein-Aktivität und Umgebungstemperatur kann als hinreichend gut bezeichnet werden.



Blutdruck (mmHg), Kallikrein-Aktivität (mU/min), Speichelsekretionsvolumen (ul/min) bei experimenteller Erhöhung der Körperaußentemperatur



Blutdruck (mmHg), Kallikrein-Aktivität (mU/min), Speichelsekretionsvolumen (µl/min) bei annähernd konstanter Körperaußentemperatur

Herrn Priv.Doz. Dr.med. G. Schmid danke ich für die Überlassung des Themas und für seine wertvollen Ratschläge bei der Fertigstellung der Arbeit.

Für die Übernahme des Korreferates Danke ich Herrn Professor Dr.med. K. Kochsiek

Herrn Professor Dr.med. A. Heidland danke ich für seine freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung des experimentellen Teils der Arbeit.

Herrn Professor Dr.med. K. Hempel danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

AMUNDSEN, E., PÜTTER, J., FRIEBERGER, P., KNÖS, M., LARSBRATEN, M. and CLEASON, G.: Methodes for the determination of glandular kallikreins by means of a chromogenic tripeptide substrate.

ARROGONI-MARTELLI, E.P. and NIELSON, C.K.: Urinary kallikrein excretion in normotensive and spontaneously hypertensive rats.
Acta pharmakol. et Toxikol. 37: 177-184 (1975)

BHOOLA, K.D., McNICOL, M.W., OLIVER, S. and FORMAN, J.: Changes in salivary enzymes in patients with sarcoidosis.
New Engl. J. Med. 281: 877-878 (1969)

BHOOLA, K.D., MORLEY, J., SCHACHTER, M. and SMAJE, L.H.:
J. Physiol. 179: p 172 (1965)

BHOOLA, K.D., MORLEY, J. and SCHACHTER, M.:
J. Physiol. 165: 36 (1963)

BHOOLA, K.D., DOREY, G.: Isolation of kallikrein containing granules from the pancreas and submaxillary gland of the cat.
J. Physiol. 203: 59 (1969)

BHOOLA, K.D.: Comparative study of the subcellular distribution of submaxillary kallikrein.
Biochem. Pharmacol. 18: 1252 (1969)

BHOOLA, K.D.: Intracellular distribution of submaxillar kallikrein.
J. Physiol. 196: 431 (1968)

BRANDTZAEG, P., GAUTVIK, K.F., NUSTAD, K. and PIERCE, J.V.: Rat submandibular kallikrein: Purification and cellular localisation.
Br. J. Pharmac. 56: 155-167 (1976)

CROXATTO, H.R. and SAN MARTIN, M.: Kallikrein-like aktivity in the urine of renal hypertensive rats.
Experientia 26: 1216-1217 (1970)

CARRETERO, O.A., OZA, N.B.: Urinary kallikrein, sodium metabolism and hypertension. In: Proceedings of an International Workshop Conference on Mechanismus of hypertension. (Ed. by M. Sambhi), p 290-299
Excerpta Medica Foundation, Amsterdam (1973)

CARRETERO, O.A., SCICLI, A.G., PIWONSKA, A. and KOCH, J.: Urinary kallikrein in rats bred for suspectivility and resistance to the hypertensive effect of salt and in New Zealand genetically hypertensive rats.
Mayo Clin. Proceedings 52: 465-467 (1977)

CUSHMAN, D.W. and CHEUNG, H.S.: Concentrations of angiotensin-sonverting enzyme in tissues of the rat.
Biochim. Biophys. Acta 250: 261-265 (1971)

EICHNER, H., EICHNER, V., FIEDLER, F., HOCHSTRASSER, K.: Zum Sekretionsverhalten der BAEE-esterase (Kallikrein) im gesunden menschlichen Parotisspeichel unter fraktionierter Abnahme bei Ruhe und Reiz.
Laryng. Rhinol. 55: 239-244 (1976)

ELLIOT, A.H. and NUZUM, F.R.: The urinary excretion of a depressor substance (Kallikrein of Frey and Kraut) in arterial hypertension.
Endokrinology 18: 462-474 (1934)

ERDÖS, E.G.: Conversion of Angiotensin I to Angiotensin II.
Am. J. Med. 60: 749-759 (1976)

ERDÖS, E.G. and YANG, H.Y.T.: Kininases. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. (ed. by E.G. Erdös), vol. 25, pp 289-323
Springer, New York (1970)

EFFKEMANN, G. und WERLE, E.:
Arch. Gyn. 1: 171 (1941)

FREY, KRAUT, WERLE: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren.
Enke Verlag, Stuttgart (1968)

FELDBERG, W., GUIMARAIS, J.A.: Some observations on saliva secretion.
J. Physiol. 85: 15 (1935)

GELLER, R.G., MARGOLIUS, H.S., PISANO, J.J. and KEISER, H.R.: Urinary kallikrein exkretion in spontaneously hypertensive rats.
Circ. Res. 36 and 37, Suppl. I: 103-106 (1975)

GELLER, R.G., MARGOLIUS, H.S., PISANO, J.J. and KEISER, H.R.: Urinary kallikrein in spontaneously hypertensive rats.
Circ. Res. 36/37, Suppl. I: 103-106 (1975)

GUTH, P.S., BOBBIN, R., CANO, G. and AMARO, J.: Venoconstriction induced by bradykinin in the rabbit ear. In: Hypotensive Peptides (Ed. by E.G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri), pp 396-406
Springer, New York (1966)

HARTENBACH, W.:
Mü. Med. Wochenschrift 96: 429 (1954)

HALL, E.R., KATO, J., ERDÖS, E.G., ROBINSON, C.J.G., OSHIMA, G.: Angiotensin I-converting enzyme in the nephron.
Life sci. 18: 1299-1303 (1976)

HEIDLAND, A., RÖCKEL, A., SCHMID, G.: Salivary Kallikrein Exkretion in Hypertension.
Klin. Wochenschr. 52: 1047-1052 Springer (1979)

HORWITZ, D., MARGOLIUS, H.S., KEISER, H.R.: Effects of potassium-intake on urinary kallikrein and aldosteron exkretion.
Clin. Res. 23: 221 A (1975)

HORTEN, E.W.:
J. Physiol. 148: 267 (1959)

HORTEN, E.W.: In: M. Schachter: Polypeptides with affect smooth muscles and blood vessels.
Pergamon Press, p 263 (1960)

HILTON, S.M.: In: E.G. Erdös, N. Back und F. Secuteri: Hypotensive Peptides.
Springer, New York, p 281 (1966)

HILTON, S.M., JONES, M.:
J. Physiol. 165: 35 (1963)

HILTON, S.M. and SCHACHTER, M.: Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels.
Pergamon Press, p 258 (1960)

HILTON, S.M. and LEWIS, G.P.:
J. Physiol. 134: 471 (1956)

HILTON, S.M. and LEWIS, G.P.:
J. Physiol. 129: 253 (1955)

HILTON, S.M. and LEWIS, G.P.:
J. Physiol. 128: 235 (1955)

IGIC, R.P., ROBINSON, C.J.G., ERDÖS, E.G.: Angiotensin I-converting enzyme activity in the plexus chorioideus and in the retina. In: Symposium on the central actions of angiotensin and Relates Hormons. (Ed. by J.P. Buckley and C.M. Ferrario)
Pergamon Press (1977)

IGARASHI, M., SATO, S., KUBO, H., SATO, T.:
Endocrinol. japon. 9: 81 (1962)

JOHNSTON, C.J., MATTHEWS, P.G. and DAX, E.: Effects of dietary sodium, diuretics and hypertension on renin and kallikrein. In: Systemic effects of antihypertensive agents. (Ed. by M.P. Sambhi), p 323-338
Stratton Intercontinental, New York (1976)

JENNER, S. and CROXATTO, H.: Urinary kallikrein from normal and hypertensive rats.
Experientia 29: 1359-1361 (1973)

KAPLAN, A.P., KAY, A.P., AUSTEN, K.F.: A prealbumin activator of prekallikrein. III. Appearence of chemotactic activity for human neutrophils by their conversion of human prekallikrein to kallikrein.
J. Exp. Med. 135: 81-97 (1972)

KUTZBACH, C. und SCHMIDT-KASTNER, G.: Properties of highly purified hog pancreatic kallikrein. In: Kininogenase (Kallikrein) (Ed. by G.L. Haberland and J.W. Rohen) pp 23-36
F.K. Schattauer, New York (1973)

KROEGER, D.C. and KRIVOY, W.: In E.G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri: Hypotensive Peptides, p 289
Springer, New York (1966)

KREUSER, W., HEIDLAND, A., HENNEMAN, H., WIGAND, M.E., KNAUF, H.: Mono- and divalent electrolyte patterns, pCO_2 and pH in relations to flow rate in normal human parotid saliva.
Europ. J. Clin. Invest. 2: 398-406 (1972)

KEISER, H.R., ANDREWS, M.J. jr., GUYTON, R.A., MARGOLIUS, H.S. and PISANO, J.J.: Urinary kallikrein in dogs with constriction of one renal artery.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151: 53-56 (1976)

LECHI, A., COVI, G., LECHI, C., CORGNATI, A., AROSI, E., ZATTI, M. and SCURO, L.A.: Urinary kallikrein excretion and plasma renin activity in patients with essentiell hypertension and primary aldosteronism.
Clin. Sci. Mol. Med. 55: 51-55 (1978)

LEENEN, F.H.H. and JONG, W. de: A solid silver clip for the introduction of predictable levels of renal hypertension in the rat.
J. appl. Physiol. 31: 142-144 (1971)

MARGOLIUS, H.S., HORWITZ, D., PISANO, J.J. and KEISER, H.R.: Urinary kallikrein exkretion in hypertensive man. Relationship to sodium intake and sodium retaining steroids.
Circ. Res. 35: 820-835 (1974)

MARGOLIUS, H.S., GELLER, R., PISANO, J.J. and SJOEDSMA, A.: Altered urinary kallikrein exkretion in human hypertension.
Lancet I I: 1063-1067 (1971)

MARGOLIUS, H.S., GELLER, R., JONG, W. de and SJOEDSMA, A.: Altered urinary kallikrein exkretion in rats with hypertension.
Circ. Res. 30: 358-362 (1972b)

MARGOLIUS, H.S., GELLER, R.G., JONG, W. de, PISANO, J.J. and SJOEDSMA, A.: Urinary kallikrein exkretion in hypertension.
Circ. Res. 31, Suppl. II: 125-131 (1972a)

MARGOLIUS, H.S.: Kallikrein-Kinin, Subgroup of the hypertension task force; Part B (1979)

MÖHRING, J., MÖHRING, B., PETRI, M. and HAACK, D.: Is vasopressin involved in the pathogenesis of malignant desoxycoticosterone hypertension in rats?
Lancet I: 170-173 (1976)

NASJLETTI, A., COLINA-CHOURIO, J. and McGIFF, J.C.: Disappearance of bradykinin in the renal circulation of dogs: Effects of kininase-inhibition.
Circ. Res. 37: 59-65 (1975)

NUSTAD, K. and PIERCE, J.V.: Purification of rat urinary kallikreins and their specific antibody.
Biochemistry 13: 2312-2319 (1974)

NUSTAD, K., PIERCE, Z.V. and VAAJE, K.: Synthesis of kallikreins by rat kidney slices.
Br. J. Pharmac. 53: 229-234 (1975)

NEEDELMAN, P., KEY, S.L., DENNY, S.E., ISAKSON, P.C. and MARSHALL, G.R.: The mechanism and modification of bradykinin-induced coronary vasodilation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 2060-2063 (1975)

NEEDELMAN, P., MARSHALL, G.R., SOBEL, B.E.: Hormone interactions in the isolated rabbit heart. Synthesis and coronary vasomotor effects of prostaglandins, angiotensin and bradykinin.
Circ. Res. 37: 802-808 (1975)

NAKAJIMA, T., SEKI, T. and ERDÖS, E.G.: Application of an insoluble Hagaman Factor complex to kinin research. In: Protides of the biological fluids - 20th colloquium. (Ed. by H. Peeters), 323-330
Pergamon Press, New York (1973)

ØRSTAVIK, T.B., BRANDTZAEG, P., NUSTAD, K., HALVORSEN, K.M.: Cellular localisation of kallikreins in rat submandibular and sublingual salivary glands.
Acta histochem. Bd. 54: 183-192 (1975)

PERITI, P. and GASPARRI, F.: In: E.G. Erdös, N. Back und F. Sicuteri: Hypotensive Peptides, 536
Springer, New York (1966)

PROCELLI, G., BIANCHI, G., CROXATTO, N.: Urinary kallikrein in a spontaneously hypertensive strain of rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. 149: 983-986 (1975)

PROCELLI, G., MARINI-BERTOLLO, G.B., CROXATTO, H.R., di JORIO, M.: Purification and chemical studies in rat urinary kallikrein.
Ital. J. Biochem. 24: 175-187 (1975)

PIERCE, J.V. and WEBSTER, M.E.: Human plasma kallidins: Isolation and chemical studies.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 5: 353-357 (1961)

PIERCE, J.V. and GUINARAES, J.A.: Further characterisation of highly purified human plasma kininogens. In: Chemistry and Biology of the Kallikrein-Kinin System in Health and Disease. (Ed. by J.J. Pisano and K.F. Ansten), Fogarty Intern. Center Proceedings no. 27, pp 121-128
U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. (1976)

RÖCKEL, A., SCHMID, G., STÜRMER, G., HEIDLAND, A.: Kallikrein-exkretion der Niere und Parotis bei renaler und essentieller Hypertonie - Effekte von Diuretika und Captopril.
Med. Welt 26: 1018-1019 (1979)

RYAN, J.W., RYAN, U.S., SCHULZ, D.R., WHITAKER, C., CHUNG, A., DORER, F.E.: Subcellular localization of pulmonary angiotensin-converting enzym (Kininase II).
Biochem. J. 146: 497-499 (1975)

SIEGENTHALER, W.: Klinische Pathophysiologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1973)

SCHMID, G., NEFF, N., HEMPEL, K. and HEIDLAND, H.: BAEE-esterase (Kallikrein)-like activity in parotid saliva of normal rats and rats with verious forms of experimental Hypertension (genuine, renovascular and D.O.C.T.M.A.-Salt-hypertension).
Contr. Nephrol. vol. 19, pp 124-133
Karger, Basel (1980)

STONER, J., MANGANIELLO, B.C., VAUGHAN, M.: Effects of bradykinin and Indometacin on cAMP and cGMP in lung slices.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70:3830-3833 (1973)

STREETEN, D.H.P., KERR, L.P., KERR, C.B., PRIOR, J.C., DALAKOS, T.G.: Hyperbradykinism: A new orthostatic syndrome.
Lancet II: 1048-1053 (1972)

SCHACHTER, M.: In: E.G. Erdös, N. Back and F. Sicuteri: Hypotensive Peptides, p 275
Springer, New York (1966)

STÄHLIN, F.O., SCHMID, G. et al.: Technique of continous Collection of Parotid Saliva in the Rat.
Res. exp. Med. 172: 247-253 (1978)

SECKER, J.: The humoral control of the secretion by the submaxillary gland of the cat following chorde stimulation.
J. Physiol. 81: 81 (1934)

TSCHESCHE, H., EHRET, W., GODEC, G., HIRSCHAUER, C., KUTZBACH, C., SCHMIDT-KASTNER, G., FIEDLER, F.: The primary structure of pig pancreatic kallikrein B. In: Kinins. Pharmacodynamics and biological Roles. Advances in Experimental medicine and Biology, vol. 70.(Ed. by F. Sicuteri, N. Back, G.L. Haberland), p 123-124
Plenum Press, New York (1976)

TERRAGNO, D.A., CROWSHAW, K., TERRAGNO, N.A., McGIFF, J.C.:
Prostaglandin synthesis by bovine mesenteric arteries and veins.
Circ. Res. 36-37, Suppl. I: 76-80 (1975)

TRAUTSCHOLD, I. and WERLE, E.: Spektrophotometrische Bestimmung des Kallikrein und seiner Inaktivatoren.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 325: 48-59 (1961)

TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E. und SCHWEITZER, G.: Kallikrein.
Hrsg. Bergmeier, pp 1071-1080
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1970)

TAKAHASHI, H., NAGASAWA, S., SUSUKU, T.: Studies on prekallikrein of bovine plasma. I. Purification and properties.
J. Biochem. 71: 471-483 (1972)

VINCI, J.M., TELLAS, T.A., BOWDER, R.E., IZZO, J.L., KEISER, H.R., RADFAR, N., TAYLOR, A.A., GILL, J.R. jr., BARTTER, F.C.: The kallikrein-kinin system in Bartter's Syndrom and its response to prostaglandin synthetase inhibition.
Clin.Res. 24: 414 (1976)

VOGEL, R., RÜDEL, G. und V. ZIEGESAR, L.:
Arzneimittelforschung 12: 881 (1962)

VOGEL, R., GLÖDEL, L.F., HUTZEL, M.:
Arzneimittelforschung 12: 885 (1962)

WOLLHEIM, E.: Eine neue, körpereigene blutdrucksenkende Substanz und ihre Bedeutung für die Pathogenese der essentiellen Hypertonie.
Schweizer Med. Wochenschrift Nr. 49: 1231 (1936)

WOTMAN, S., GREENBAUM, L. and MANDEL, I.D.: Studies on human salivary kallikrein.
Biochem. Pharmakol. 18: 1261-1264 (1969)

WORTHINGTON, K.J., CUSCHIER, A.: A study on the pancreatic Kallikrein with the substrate benoyl arginine ethyl ester using a Spectrophotometric assay.
Clin. Chem. Acta 52: 129 (1974)

WERLE, E., RODEN, P. v.:
Biochem. Z. 301: 328 (1939)

WERLE, E., LORENZ, W.:
Arch. int. Pharmacodyn. 161: 477 (1966)

WERLE, E., VOGEL, R.:
Abstr. Int. Biochemie-Kongress, Wien (1958)

WERLE, E., VOGEL, R.:
Arch. Int. Pharmacodyn. 126: 171 (1960)

WERLE, E.: In: M. Schachter: Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels, p 199
Pergamon Press (1960)

WERLE, E., RÜDEL, G., VOGEL, R.:
Arch. int. Pharmacodyn 149: 119 (1964)

WERLE, E., TRAUTSCHOLD, I., LEYSATZ, G.: Isolierung und Struktur des Kallidins.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 326: 174 (1961)

WERLE, E. and KORSTEN, H.: Der Kallikreingehalt des Harns, des Speichels und des Blutes bei Gesunden und Kranken.
Z. Ges. Exp. Med. 103: 153 f (1938)

WONG, P.Y., TALAMO, R.C., WILLIAMS, G.H. and COLEMAN, R.W.: Response of the kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems to saline infusion and upright posture.
J. Clin. Invest. 55: 691-698 (1975)

WONG, P.Y., TALAMO, R.C., BABIOR, B.M., RAYMOND, G.G., COLMAN, R.W.: Kallikrein-kininsysteme in postgastrectomy dumping syndrome.
Ann. Intern. Med. 80: 577-581 (1974)

WEBER, P.C. und MANN, K.: Gewebshormone der Niere.
Internist 18: 529-537 (1977)

WEBSTER, M.E. and GILMORE, J.P.: Influence of Kallidin-10 on renal function.
Am. J. Physiol. 206: 714-718 (1964)

ZINNER, S.H., MARGOLIUS, H.S., ROSNER, B., KEISER, H.R. and KASS, E.H.: Familial aggregation of urinary kallikrein concentration in childhood.
Am. J. Epidemiol. 104: 124-132 (1976)

ZINNER, S.H., MARGOLIUS, H.S., ROSNER, B. and KASS, E.H.: Eight year longitudinal study of blood pressure and urinary kallikrein in childhood.
Clin. Res. 25: 266 A (1977)

L E B E N S L A U F

Name	Norbert N e f f	
Geboren	19.10.1950 in Schneppenbach / Aschaffenburg	
Eltern	Hubert Neff und Lidwina Neff, geb. Huth	
Staatsangeh.	Deutscher	
Familienstand	Verheiratet	
Ehefrau	Elisabeth, geb. Hofman	
Schulausbildung	1957 - 62	Grundschule in Schöllkrippen
	1962 - 66	Human. Gymn. Salvatorkolleg Lochau
	1966 - 71	Human. Gymn. Salvatorkolleg Bad-Wurzach
	1971	Abitur
Studium	1972 (SS)	Studium der Medizin in Würzburg
	1974	Physikum
	1978	Staatsexamen an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Berufliche Tätigkeit	1979 - 80	Chir. Ass. Arzt, Kreiskrankenhaus Gerolzhofen
	1980/81	Grundwehrdienst
Berufliches Ziel	Facharzt für Chirurgie	

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80